

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Offic. européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 672 677 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 95103332.3

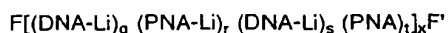
(51) Int. Cl.⁶: **C07H 21/00, C08L 77/00,
C12Q 1/68, A61K 31/70**

(22) Anmeldetag: 08.03.95

(30) Priorität: 14.03.94 DE 4408528

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.09.95 Patentblatt 95/38(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Brüningstrasse 50
D-65929 Frankfurt am Main (DE)(72) Erfinder: **Uhlmann, Eugen, Dr.**
Zum Talblick 31
D-61479 Glashütten (DE)
Erfinder: **Breipohl, Gerhard, Dr.**
Geisenheimer Strasse 95
D-60529 Frankfurt (DE)(54) **Polyamid-Oligonucleotid-Derivate, deren Herstellung und Verwendung.**

(57) Es werden Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel



beschrieben, worin q, r, s, t unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder mehrerer benachbarter q, r, s und t ≥ 2 sind; x 1 bis 20 ist; DNA für eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA oder ein bekanntes Derivat derselben steht; Li eine kovalente Verknüpfung zwischen DNA und PNA ist, wobei die kovalente Verknüpfung eine Bindung oder einen organischen Rest mit mindestens einem Atom aus der Reihe C, N, O oder S beinhaltet; PNA eine Polyamidstruktur bedeutet, welche mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist; und F und F' Endgruppen sind und/oder über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind, sowie deren physiologisch verträgliche Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Anwendung als Arzneimittel, als Sonde und als Primer.

EP 0 672 677 A2

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Polyamid-Oligonucleotid-Derivate mit wertvollen physikalischen, biologischen und pharmakologischen Eigenschaften.

Ihre Anwendung bezieht sich auf die Verwendung als Inhibitoren der Genexpression (Antisense Oligonucleotide, Ribozyme, Sense Oligonucleotide und Triplex Forming Oligonucleotide), als Sonden zum Nachweis von Nucleinsäuren und als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

Oligonucleotide finden in wachsendem Maße Anwendung als Inhibitoren der Genexpression (G. Zon, *Pharmaceutical Research* 5, 539 (1988); J. S. Cohen, *Topics in Molecular and Structural Biology* 12 (1989) Macmillan Press; C. Helene and J. J. Toulme, *Biochimica et Biophysica Acta* 1049, 99 (1990); E. Uhlmann and A. Peyman, *Chemical Reviews* 90, 543 (1990)). Antisense Oligonucleotide sind Nucleinsäure-Fragmente, deren Basensequenz komplementär ist zu einer zu inhibierenden mRNA. Diese Target-mRNA kann zellulären, viralen oder sonstigen pathogenen Ursprungs sein. Als zelluläre Target-Sequenzen kommen beispielsweise die von Rezeptoren, Zelladhäsionsproteinen, Enzymen, Immunmodulatoren, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Ionenkanälen oder Onkogenen in Frage. Die Inhibition der Virus Vermehrung mit Hilfe von Antisense Oligonucleotiden wurde beispielsweise für HBV (Hepatitis B Virus), HSV-1 und -2 (Herpes Simplex Virus Typ I und II), HIV (Human Immunodeficiency Virus) und Influenza-Viren beschrieben. Dabei setzt man Oligonucleotide ein, die zur viralen Nucleinsäure komplementär sind. Sense Oligonucleotide sind dagegen in ihrer Sequenz so konzipiert, daß sie beispielsweise Nucleinsäure-bindende Proteine oder Nucleinsäure-prozessierende Enzyme binden ("einfangen") und so deren biologische Aktivität inhibieren (C. Helene and J. J. Toulme, *Biochimica et Biophysica Acta* 1049, 99 (1990)). Als virale Targets sind hier beispielsweise die Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase und Transaktivator-Proteine zu nennen. Triplex Forming Oligonucleotide haben im allgemeinen die DNA als Target und bilden nach Bindung an diese eine tripelhelicale Struktur aus.

Während mit Hilfe der Antisense Oligonucleotide im allgemeinen die Prozessierung (Splicing etc.) der mRNA oder deren Translation in das Protein gehemmt wird, hemmen Triplex Forming Oligonucleotide die Transcription oder Replikation der DNA (C. Helene und J.J. Toulme; *Biochim. Biophys. Acta* 1049 (1990) 99-125; E. Uhlmann and A. Peyman, *Chemical Reviews* 90, 543 (1990)). Es ist aber auch möglich, einzelsträngige Nucleinsäuren in einer ersten Hybridisierung mit einem Antisense Oligonucleotid unter Ausbildung eines Doppelstranges zu binden, der dann in einer zweiten Hybridisierung mit einem Triplex Forming Oligonucleotid eine Triplex-Struktur ausbildet. Die Antisense und Triplex Bindungsregionen können dabei entweder in zwei separaten Oligonucleotiden oder aber in einem Oligonucleotid beherbergt sein. Eine weitere Anwendung synthetischer Oligonucleotide sind die sogenannten Ribozyme, welche die Target-RNA infolge ihrer Ribonuclease-Aktivität zerstören (J.J. Rossi and N. Sarver, *TIBTECH* (1990) 8, 179; Castanetto et al., *Critical Rev. Eukar. Gene Expr.* (1992) 2, 331).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch im Sinne von Aptameren in der Therapie eingesetzt werden. Aptamere sind oligomere Nucleinsäuren oder deren Analoga, welche mit hoher Affinität an Proteine binden. Das Auffinden der Aptamere erfolgt durch in vitro Selektion aus einem Zufallsgemisch (Famulok und Szostak (1992) *Angew. Chem.* 104, 1001-1011) und wurde für ein Thrombin-bindendes Aptamer erfolgreich durchgeführt (Bock et al. (1992) *Nature* 355, 564-566). Man kann dabei so verfahren, daß die Basensequenz des Aptamers durch Screening eines Oligonucleotid-Gemisches bestimmt wird und diese Basensequenz dann auf Polyamid-Oligonucleotid-Analoga übertragen wird.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die bindende Region des Aptamers zur Erleichterung der Identifikation durch einen separaten nichtbindenden Teil des Moleküls codiert wird (Brenner und Lerner (1992) *PNAS* 89, 5381-5383).

In der DNA-Diagnostik werden Nucleinsäure-Fragmente mit geeigneter Markierung als sogenannte DNA-Sonden oder DNA-Probes für die spezifische Hybridisierung an eine nachzuweisende Nucleinsäure eingesetzt. Die spezifische Ausbildung des neuen Doppelstranges wird dabei mit Hilfe der Markierung, die vorzugsweise nicht radioaktiv ist, verfolgt. Auf diese Weise lassen sich genetische, maligne, virale oder durch andere pathogene verursachte Krankheiten nachweisen.

Für die meisten genannten Anwendungen sind Oligonucleotide in ihrer natürlich vorkommenden Form wenig oder völlig ungeeignet. Sie müssen chemisch so modifiziert werden, daß sie den speziellen Anforderungen gerecht werden.

Damit Oligonucleotide in biologischen Systemen, beispielsweise zur Inhibition der Virus-Vermehrung eingesetzt werden können, müssen sie folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Sie müssen unter in vivo Bedingungen, also sowohl im Serum als auch intrazellulär, eine ausreichend große Stabilität aufweisen.
2. Sie müssen so beschaffen sein, das sie die Zell- und Nucleus-Membran passieren können.
3. Sie müssen unter physiologischen Bedingungen in Basen-spezifischer Weise an ihre Target-Nucleinsäure binden, um den inhibitorischen Effekt zu entfalten.

Für DNA-Sonden sind die Punkte 1 bis 3 keine Voraussetzung; jedoch müssen diese Oligonucleotide so derivatisiert sein, daß ein Nachweis, beispielsweise mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Kolorimetrie oder spezifischer Färbung, möglich ist (Beck und Köster, Anal. Chem. 62, 2258 (1990)).

Die chemische Veränderung der Oligonucleotide erfolgt meistens in der Weise, daß Phosphatrückgrat, Ribose-Einheit oder die Nucleobasen entsprechend verändert werden (J. S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Eine weitere häufig genutzte Methode ist die Herstellung von Oligonucleotid-5'-Konjugaten durch Umsetzung der 5'-Hydroxy-Gruppe mit entsprechenden Phosphorylierungs-Reagenzien. Wenn dagegen alle Internucleotid-Phosphat-Reste verändert werden, verändern sich die Eigenschaften der Oligonucleotide oft drastisch. Beispielsweise ist die Löslichkeit von Methylphosphonaten in wässrigem Medium stark vermindert, während All-Phosphorothioat-Oligonucleotide oft sequenzspezifisch wirken.

Kürzlich wurden Polyamid-Nucleinsäure-Derivate beschrieben (Michael Egholm, Peter E. Nielsen, Rolf H. Berg and Ole Buchardt, Science 1991, 254, 1497-1500; WO 92/20702; M. Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7), die mit höherer Affinität als natürliche Oligonucleotide an komplementäre Zielsequenzen (DNA oder RNA) binden. Diese sogenannten Peptide bzw. Polyamide Nucleic Acids (PNA) sind DNA-analoge Verbindungen, in denen das Deoxyribose-Phosphat-Gerüst durch ein Polyamid-Oligomer ersetzt wurde. Diese Verbindungen haben den Vorteil gegenüber den natürlichen Oligonucleotiden, daß sie im Serum sehr stabil sind. Sie haben aber andererseits folgende nachteilige Eigenschaften:

(1) Sie werden nicht bzw. nur in nicht nachweisbarer Menge in Zellen aufgenommen. Da Antisense oder Triplex-Forming Oligonucleotide ihre Aktivität aber nur in der Zelle entfalten können, sind die PNA's als solche ungeeignet zur Inhibition der Genexpression in vivo.

(2) Die PNA's tendieren in wässriger Lösung, also auch unter physiologischen Bedingungen zur Aggregation. Sie sind daher in wässrigem Puffer schlecht löslich und stehen nicht für die Hybridisierung an komplementäre Sequenzen zur Verfügung.

(3) Die PNA's haben zudem eine hohe Affinität zu verschiedenen Materialien wie ®Sephadex (Fa. Pharmacia) oder ®Bond Elut (Fa. Varian), die bei der Aufreinigung der Oligomeren Verwendung finden, so daß die PNA's oft nur in schlechten Ausbeuten zu isolieren sind.

(4) Ein weiterer gravierender Nachteil der PNA's besteht darin, daß sie nicht in einer eindeutigen Orientierung an komplementäre Nucleinsäuren binden.

Deshalb ist die Sequenzspezifität gegenüber den natürlichen Oligonucleotiden reduziert. Während natürliche Nucleinsäuren an komplementäre Nucleinsäuren im allgemeinen in antiparalleler Orientierung hybridisieren, können PNA's sowohl in antiparalleler als auch in paralleler Orientierung binden.

(5) In WO 92/20702 ist ein Oligonucleotid-PNA-Konjugat $(T)_7(5'-L-N)(t)_6$ -Ala erwähnt (Fig. 25; substitute sheet), wobei $(T)_7$ ein natürliches Heptathymidylat Oligonucleotid bedeutet, das über sein 5'-O-Phosphat und 4-Hydroxybuttersäure (L) an die primäre Aminofunktion (N) eines PNA-Hexathymidylats $(t)_7$ und Alanin (Ala) gebunden ist. Es wurden weder Synthese dieser Verbindung noch irgendwelche Eigenschaften beschrieben.

(6) PNA's zeigen in Zellkulturexperimenten im μ molaren Bereich stark cytotoxische Eigenschaften.

Die Orientierung der basenpaarenden Nucleinsäurestränge ist wie folgt definiert: (vgl. Egholm et al.; Nature 365 (1993) 566-568).

A)

5' ----- 3'	DNA	ap Duplex ap = antiparallel
3' ----- 5'	DNA	

B)

5' ----- 3'	DNA	p Duplex p = parallel
5' ----- 3'	DNA	

C)

5

5' ----- 3'	DNA	ap Duplex (DNA•PNA)
C ----- N	PNA	

D)

10

5' ----- 3'	DNA	p Duplex (DNA•PNA)
N ----- C	PNA	

E)

15

C ----- N	PNA	ap•ap Triplex (DNA•DNA•PNA) Pu = Purin-reicher Strang
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
3' ----- 5'	DNA	

20

F)

25

N ----- C	PNA	ap•p Triplex (DNA•DNA•PNA)
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
3' ----- 5'	DNA	

G)

30

N ----- C	PNA	ap•p Triplex (PNA•DNA•PNA)
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
C ----- N	PNA	

H)

35

C ----- N	PNA	ap•ap Triplex (PNA•DNA•PNA)
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
C ----- N'	PNA	

40

I)

45

N ----- C	PNA	p•p Triplex (DNA•DNA•PNA)
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
N ----- C'	PNA	

50

55

K)

C ----- N	PNA	p-ap Triplex (DNA-DNA-PNA)
5' ----- 3'	DNA (Pu)	
N ----- C	PNA	

wobei

5' das 5'-Ende eines Oligonucleotids,

3' das 3'-Ende eines Oligonucleotids,

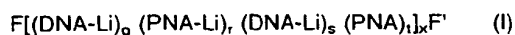
N den Aminoterminus eines PNA's

C den Carboxyterminus eines PNA's bedeuten.

Die Fälle A) - D) sind beispielhaft für die prinzipiell möglichen Orientierungsarten der Antisense-Oligomeren. Die Fälle E) - F) zeigen Möglichkeiten der Triplexbildung an einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleinsäuren. Dabei können zwei der PNA- bzw. DNA-Einzelstränge miteinander verknüpft sein. Beispielsweise kann in E) der N-Terminus des PNA's mit dem 5'-Ende der DNA oder in F) der C-Terminus des PNA mit dem 5'-Ende der DNA verknüpft sein.

Die Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Polyamid-Oligonucleotid-Derivate herzustellen, in denen oben genannten Nachteile eliminiert sind.

Gegenstand der Erfindung sind Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel I,



dadurch gekennzeichnet, daß

q, r, s, t unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder mehrerer benachbarter q, r, s und t ≥ 2 ist;

x 1 bis 20, bevorzugt 1 bis 5, besonders bevorzugt 1 ist;

DNA für eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA oder ein bekanntes Derivat derselben steht;

Li eine kovalente Verknüpfung zwischen DNA und PNA ist, wobei die kovalente Verknüpfung eine Bindung oder einen organischen Rest mit mindestens einem Atom aus der Reihe C, N, O oder S beinhaltet;

PNA eine Polyamidstruktur bedeutet, welche mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist; und

F und F' Endgruppen sind und/oder über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind (cyclische Verbindungen),

sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

Ferner seien besonders Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel I genannt, in denen x für 1 steht und gleichzeitig

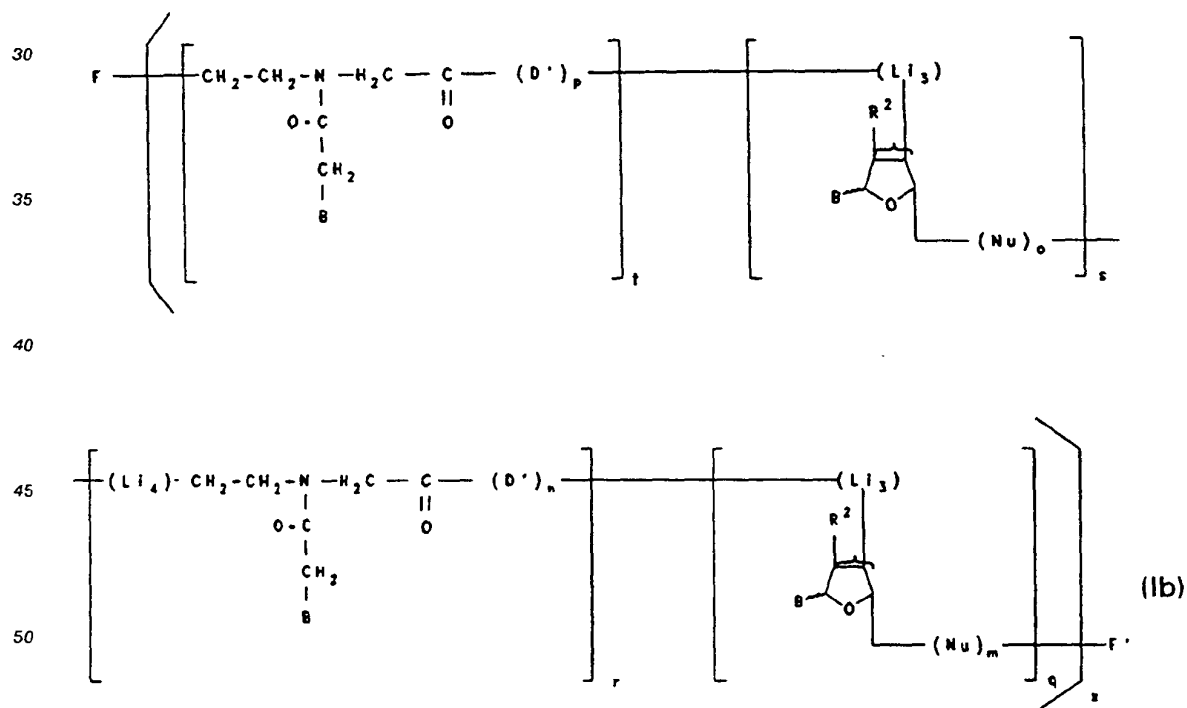
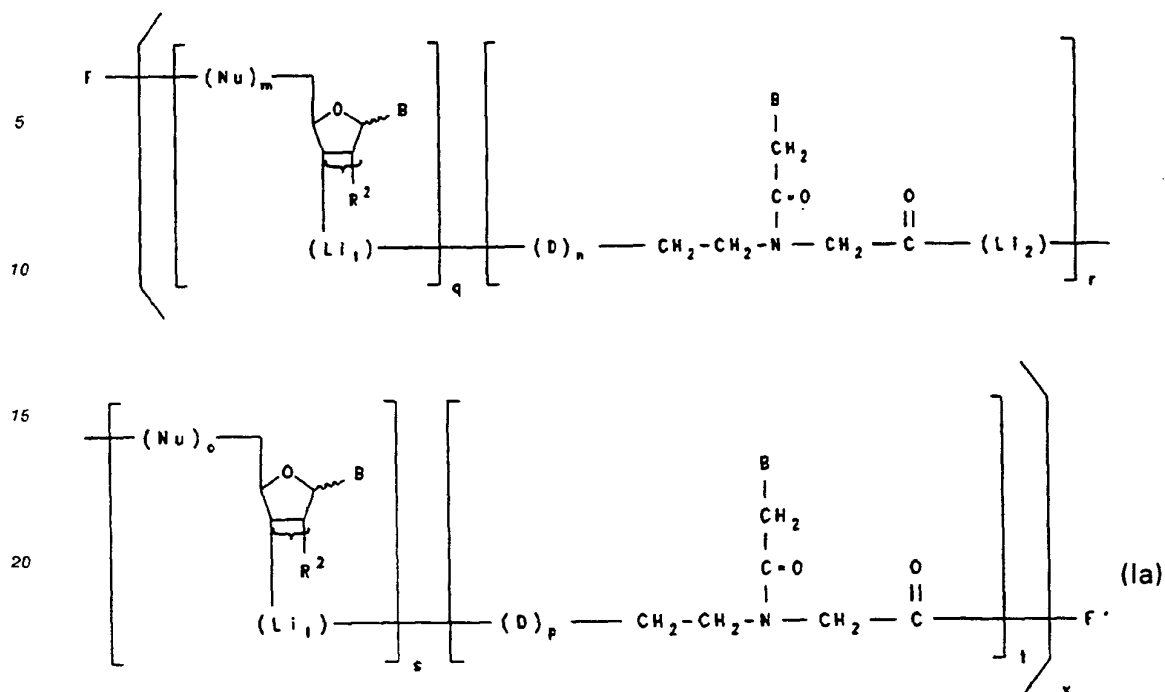
q = r = 1 und s = t = Null oder

r = s = 1 und q = t = Null oder

q = r = s = 1 und t = Null oder

r = s = t = 1 und q = Null sind.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formeln Ia und Ib,



55 worin

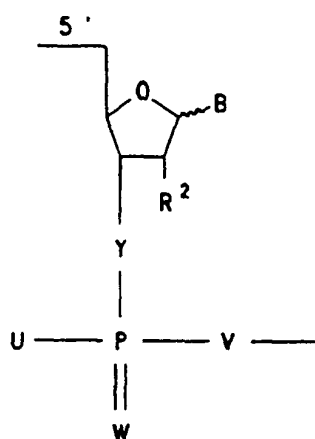
x

q, r, s, t

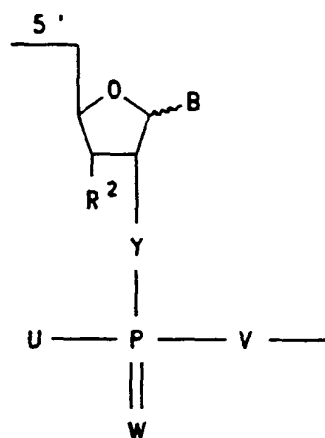
1 bis 20 bedeutet, wobei für $x > 1$ $r = s = 1$ und gleichzeitig $q = t = \text{Null}$ und $o = n = \text{Null}$ bis 5 sind;

unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder

mehrerer benachbarter q, r, s und t₂ ist;
 R² Wasserstoff, Hydroxy, C₁-C₁₈-Alkoxy, bevorzugt C₁-C₆-Alkoxy, Halogen, wie F oder Cl, bevorzugt F, Azido oder Amino bedeutet;
 B unabhängig voneinander für eine in der Nucleotidchemie übliche Base, beispielsweise für natürliche Basen wie Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin, Uracil, Inosin oder unnatürliche Basen wie beispielsweise Purin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N⁴N⁴-Ethanocytosin, N⁶N⁶-Ethano-2,6-diaminopurin, Pseudoisocytosin, 5-Methylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-(C₃-C₆)-Alkynyluracil, 5-(C₃-C₆)-Alkynylcytosin oder deren Prodrugformen steht,
 und die "geschweifte Klammer" andeutet, daß sich R² und der benachbarte Substituent in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können;
 Nu für einen Rest der Formeln IIa oder IIb steht



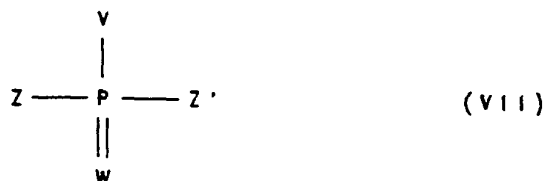
(II a)



(II b)

worin
 R² und B wie oben definiert sind;
 U Hydroxy, Mercapto, C₁-C₁₈-Alkyl, bevorzugt C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₁₈-Alkoxy, bevorzugt C₁-C₈-Alkoxy, C₆-C₂₀-Aryl, bevorzugt C₆-C₁₂-Aryl, C₆-C₁₄-Aryl-C₁-C₈-alkyl, bevorzugt C₆-Aryl-C₁-C₄-alkyl, NHR³ oder NR³R⁴ bedeutet und
 R³ C₁-C₁₈-Alkyl oder C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkyl ist, vorzugsweise C₁-C₈-Alkyl oder C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkyl, besonders bevorzugt C₁-C₄-Alkyl oder Methoxyethyl und
 R⁴ C₁-C₁₈-Alkyl, vorzugsweise C₁-C₈-Alkyl und besonders bevorzugt C₁-C₄-Alkyl, ist oder
 R³ und R⁴ zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, wie beispielsweise Morpholin;
 V Oxy, Sulfanidyl oder Imino bedeutet;
 W Oxo oder Thioxo bedeutet;
 Y Oxy, Sulfanidyl, Methylen oder Imino bedeutet;
 m = Null bis 20;
 o = Null bis 20;
 D einen Rest der Formel III bedeutet

R⁰ Wasserstoff, C₁-C₁₈-Alkanoyl, bevorzugt C₈-C₁₈-Alkanoyl, C₁-C₁₈-Alkoxy-carbonyl, C₃-C₈-Cycloalkanoyl, C₇-C₁₅-Aroyl, C₃-C₁₃-Heteroaroyl oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift; oder, falls k = Null ist, R⁰ Wasserstoff ist oder zusammen mit V für einen Rest der Formel VII



steht, worin

Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, C₁-C₂₂-Alkoxy, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Alkoxy, C₁-C₁₈-Alkyl, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Alkyl, C₆-C₂₀-Aryl, bevorzugt C₆-C₁₆-Aryl, C₆-C₁₄-Aryl-C₁-C₁₈-Alkyl, bevorzugt C₆-Aryl-C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₂₂-Alkylthio, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Alkylthio, NHR³, NR³R⁴, oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und

worin
wie oben definiert sind;
Wasserstoff oder Q⁰

wobei R¹ immer nur dann Wasserstoff ist, wenn gleichzeitig l = Null und in Formel Ia t = Null und s = 1 und Li₁ eine Struktur der Formel V mit V' = Bindung, G = Bindung, ε = 1 und G' = Oxy, Sulfanidyl, Imino oder einen Rest der Formel VI mit U = Z

oder
in Formel Ib q = 1 oder q = r = Null und in F' = V' - (A)_l - R¹ mit V' = V bedeuten,

A und Q unabhängig voneinander den Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure, bevorzugt aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure, N-(2-Aminoethyl)glycin bedeuten;

Hydroxy, OR', NH₂, NHR'' bedeutet mit
R' = C₁-C₁₈-Alkyl, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Alkyl und
R'' = C₁-C₁₈-Alkyl, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Alkyl, C₁-C₁₈-Aminoalkyl, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Aminoalkyl, C₁-C₁₈-Hydroxyalkyl, bevorzugt C₁₂-C₁₈-Hydroxyalkyl;

wie oben definiert ist;

eine Bindung oder V ist, wobei in F' nur in Formel Ib mit q = Null und r = 1 V' immer für eine Bindung steht;

Null bis 10 ist;

Null bis 10 ist;

mit der Maßgabe, daß

a) falls in der Verbindung der Formel Ia t = Null und s = 1 sind, und Li₁ = (V') - (G) - (G') mit V' = Verbindung der Formel VI, G = C₂-C₁₂-Alkylen und G' = CO stehen, bedeutet in F' = - (O)_l - R¹ l = Null bis 10 und R¹ = Q⁰;

b) falls in der Verbindung der Formel Ia s = t = Null ist, steht Li₂ für eine Bindung;

c) falls in der Verbindung der Formel Ib t = Null und s = 1 sind, steht Li₃ für eine Bindung;

d) falls in der Verbindung der Formel Ib $s = t = \text{Null}$ ist, steht Li_4 für eine Bindung; wobei jedes Nucleotid in seiner D- bzw. L-Konfiguration vorliegen kann und sich die Base in α - oder β -Stellung befinden kann.

- Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel Ia und Ib, in denen sich die Base am Zucker in β -Stellung befindet,
- $x = 1$ ist und
- $q = r = 1, s = t = \text{Null}$ oder
- $r = s = 1, q = t = \text{Null}$ oder
- $q = r = s = 1, t = \text{Null}$ oder
- $r = s = t = 1, q = \text{Null}$ sind.

Insbesondere bevorzugt sind Oligomere der Formeln Ia und Ib, worin V' , V , Y und W die Bedeutung von Thio, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben; ganz besonders bevorzugt sind diese, falls zusätzlich R^2 gleich Wasserstoff ist.

- Insbesondere bevorzugt sind auch Oligomere der Formeln Ia und Ib mit $\epsilon = 1$, in denen
- Li_1, Li_4
- a) eine Verbindung der Formel V, in der $V' = \text{Sauerstoff}$ oder eine Verbindung der Formel VI, $G = \text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-Alkyl}$, $G' = \text{-CONH-}$
- b) eine Verbindung der Formel V, in der G, V' eine Bindung und G' eine Verbindung der Formel VI ist mit bevorzugt $U = V = W = Y = \text{Sauerstoff}$ oder $U = W = Y = \text{Sauerstoff}$ und $V = \text{Imino}$

- Li_2, Li_3
- a) eine Verbindung der Formel V mit $V' = \text{Imino}$, $G = \text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-Alkyl}$ und $G' = \text{Verbindung der Formel VI}$
- b) eine Verbindung der Formel V mit $V' = \text{Imino}$, G und $G' = \text{Bindung}$
- c) eine Verbindung der Formel V mit $V' = \text{Imino}$, $G = \text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-Alkyl}$ und $G' = V$ mit bevorzugt $U = V = W = Y = \text{Sauerstoff}$.

- Ganz besonders bevorzugt sind Oligomere der Formeln Ia und Ib, worin V' , V , Y und W die Bedeutung von Thio, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben, R^2 gleich Wasserstoff ist, Li_1 die Bedeutung von $-\text{V}'\text{-}[\text{CH}_2]_n\text{C(O)-NH-}$ mit $V' = \text{Verbindung der Formel VI}$ mit $U = V = W = Y = \text{Sauerstoff}$ oder Li_2 die Bedeutung von $-\text{HN-}[\text{CH}_2]_n(\text{G}')\text{-}$ haben, wobei $n = 2$ bis 5 und G' gleich der Formel VI mit U, V, W und $Y = \text{Sauerstoff}$ ist.

- Außerdem werden Oligomere der Formeln Ia und Ib bevorzugt, worin V' , V, Y und W die Bedeutung von Thio, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben, R^2 gleich Wasserstoff ist, Li_1 die Bedeutung von $-\text{O-}[\text{CH}_2]_n\text{C(O)NH-}$ oder Li_2 die Bedeutung von $-\text{HN-}[\text{CH}_2]_n(\text{G}')\text{-}$ haben, wobei $n = 2$ bis 5 und G' gleich der Formel VI mit U, V, W und $Y = \text{Sauerstoff}$ ist und $q = \text{Null}$ und $r = s = t = 1$ sind.

- Bevorzugt sind außerdem Oligomere der Formeln Ia und b, worin die geschweifte Klammer bedeutet, daß sich R^2 in 3' Stellung (siehe Formel Ib) befindet. Die bevorzugte Base ist hierbei Adenin.

- Die Erfindung ist nicht auf α - und β -D- bzw. L-Ribofuranoside, α - und β -D- bzw. L-Desoxyribofuranoside und entsprechende carbocyclische Fünfringanaloga beschränkt, sondern gilt auch für Oligonucleotidanaloga, die aus anderen Zucker-Bausteinen aufgebaut sind, beispielsweise ringerweiterte und ringverengte Zucker, acyclische, ringverbrückte oder geeignete andersartige Zucker-Derivate. Die Erfindung ist ferner nicht auf die in Formel I beispielhaft aufgeführten Derivate des Phosphat-Restes beschränkt, sondern bezieht sich auch auf die bekannten Dephospho-Derivate.

- Der Oligonucleotid-Teil (DNA in Formel I) kann also in vielfältiger Weise von der natürlichen Struktur abgewandelt sein. Solche Modifikationen, die nach an sich bekannten Methoden eingeführt werden, sind beispielsweise:

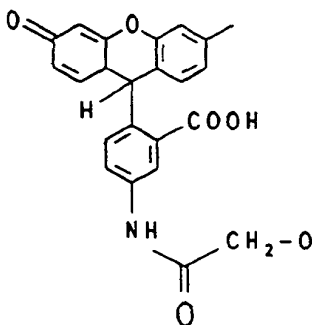
- a) Modifikationen der Phosphatbrücke
- Beispielhaft seien genannt: Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Methylphosphonate, Phosphoramidate, Boranophosphate, Phosphatmethylester, Phosphatethylester, Phenylphosphonate. Bevorzugte Modifikationen der Phosphatbrücke sind Phosphorothioate, Phosphorodithioate und Methylphosphonate.
- b) Ersatz der Phosphatbrücke
- Beispielhaft seien genannt: Ersatz durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylsulfon, Silylgruppen. Bevorzugte ist der Ersatz durch Formacetale und 3'-Thioformacetale.
- c) Modifikationen des Zuckers
- Beispielhaft seien genannt: α -anomere Zucker, 2'-O-Methylribose, 2'-O-Butylribose, 2'-O-Allylribose, 2'-Fluoro-2'-desoxyribose, 2'-Amino-2'-desoxyribose, α -Arabinofuranose, Carbocyclische Zuckeranaloga. Bevorzugte Modifikation ist die durch 2'-O-Methylribose und 2'-O-n-Butylribose.

d) Modifikationen der Basen welche die Spezifität der Watson-Crick Basenpaarung nicht verändern
 Beispielhaft seien genannt: 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Propinyl-2'-desoxycytidin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin, 5-Fluoro-2'-desoxycytidin, 5-Fluor-2'-desoxyuridin, 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin, 5-Methyl-2'-desoxycytidin, 5-Brom-2'-desoxycytidin. Bevorzugte Modifikationen sind 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin und 5-Propinyl-2'-desoxycytidin.

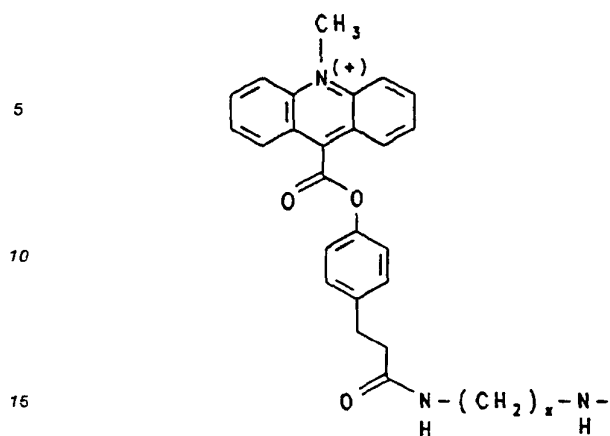
e) 3'-3'- und 5'-5'-Inversionen [z.B. M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757]

f) 5'- und 3'-Phosphate, sowie 5'- und 3'-Thiophosphate.

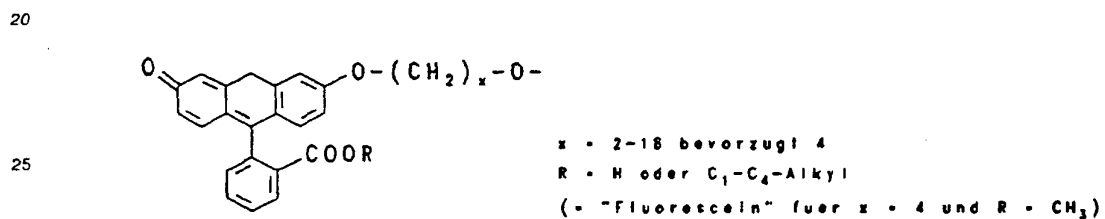
Beispielhaft für Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, sind verschiedene lipophile Reste wie $-O-(CH_2)_x-CH_3$, worin x eine ganze Zahl von 6 bis 18 bedeutet, $-O-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$, worin n und m unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 6 bis 12 bedeuten, $-O-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_3-CH_3$, $-O-(CH_2CH_2O)_8-(CH_2)_{13}-CH_3$ und $-O-(CH_2CH_2O)_7-(CH_2)_{15}-CH_3$, aber auch Steroid-Reste wie Cholesteryl oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur rezeptorvermittelten Endozytose der Oligonucleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Unter Markierungs-Gruppen sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl-(= N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweisbare Digoxigenin-System, die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe oder aber Linker-Arme mit funktionellen Gruppen, die eine nachträgliche Derivatisierung mit nachweisbaren Reporter-Gruppen gestatten, beispielsweise ein Aminoalkyl-Linker, der mit einem Acridinium-Aktivester zur Chemilumineszenz-Probe umgesetzt wird. Typische Markierungsgruppen sind:



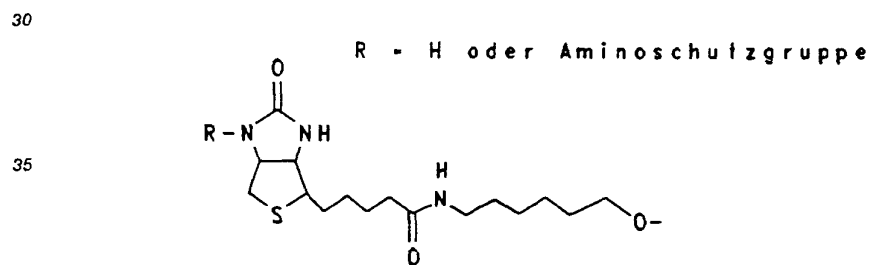
Fluorescein-Derivat



Acridinium-Ester



Fluorescein-Derivat



Biotinkonjugat (= "Biotin" fuer $R = Fmoc$)

45

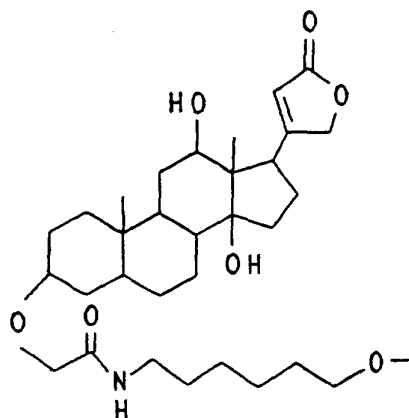
50

55

5

10

15



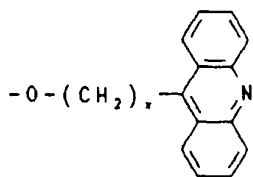
20

Digoxigeninkonjugat

Oligonucleotidanaloga, die an Nucleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen, enthalten z. B. Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugate. Typische interkalierende und quervernetzende Reste sind:

25

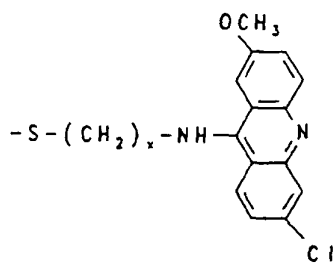
30



Acridinderivat $x = 2-12$, bevorzugt 4

35

40

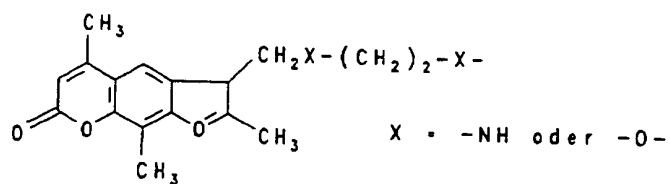


45

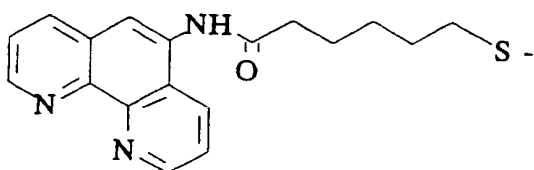
$x = 2-12$, bevorzugt 4

50

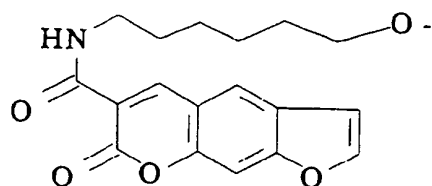
55



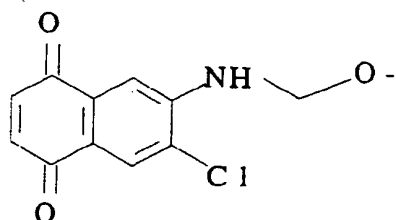
10 Trimethylpsoralen-konjugat (= "Psoralen" fuer $\text{X} = \text{O}$)



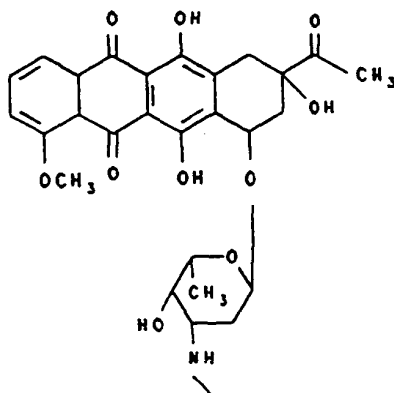
20 Phenanthrolinkonjugat



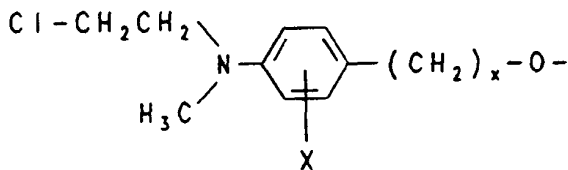
30 Psoralenkonjugat



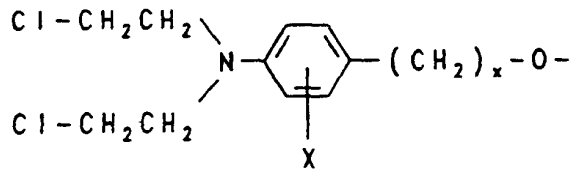
40 Naphthochinonkonjugat



Daunomycinderivat



$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} \text{-C-R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$



$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} \text{-C-R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$

Beispiele für Gruppen NR^3R^4 , in denen R^3 und R^4 zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom enthält, seien der Morpholinyl- und der Imidazolidinyl-Rest genannt.

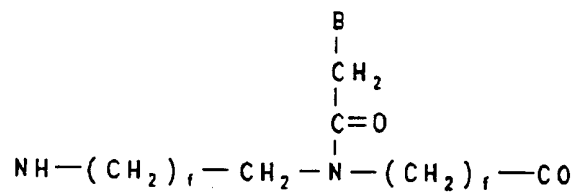
Der Polyamid-Teil (PNA in Formel I) besteht aus Amid-Strukturen, welche mindestens eine Nucleobase enthalten, die von Thymin verschieden ist. Solche Polyamid-Strukturen sind beispielsweise aus folgenden

Bausteinen a) bis h), bevorzugt a), aufgebaut, worin f für 1 bis 4, bevorzugt für 1 oder 2 und g für Null bis 3, bevorzugt für Null bis 2 stehen:

a)

5

10



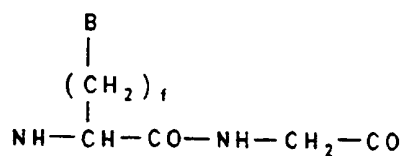
15

Hyrup et al. ; J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1993, 519

b)

20

25

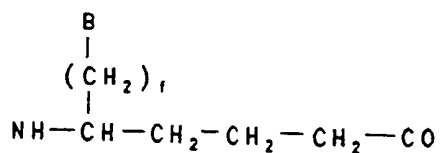


De Konig et al. (1971) Rec. Trav. Chim. 91, 1069

c)

30

35

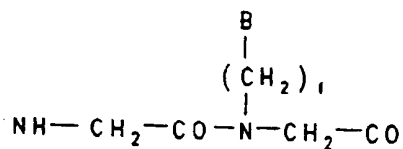


Huang et al. (1991) J. Org. Chem. 56, 6007

d)

40

45

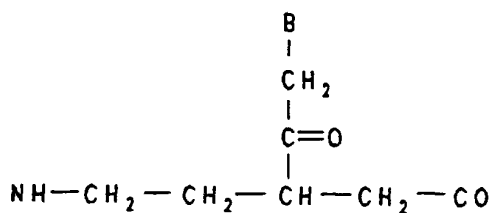


Almarsson et al. (1993) Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7518

50

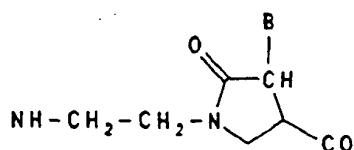
55

e)



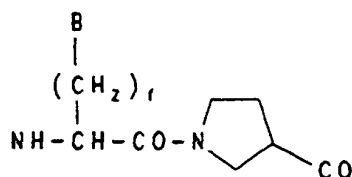
Froehler et al. (1991) WO 93/10820

f)



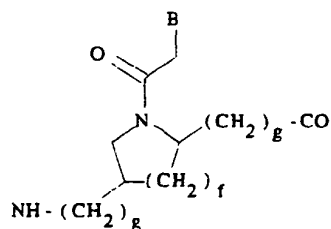
Froehler et al. (1991) WO 93/10820

g)



Lewis (1993) Tetrahedron Lett. 34, 5697.

h)



Endgruppen für PNA's sind in den gleichzeitig eingereichten Anmeldungen mit den Titeln "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe" (HOE 94/F 060, DE-P 44 08 531.1) und "PNA-Synthese unter Verwendung einer basenlabilen Amino-Schutzgruppe" (HOE 94/F 059, DE-P 44 08 533.8) beschrieben.

Bevorzugt sind Polyamidstrukturen, die aus Strukturen entsprechend a) aufgebaut sind. Besonders bevorzugt sind letztere, falls f = 1 ist.

Die Darstellung von Polyamid-Oligonucleotid-Derivaten der Formel I erfolgt ähnlich wie die Synthese von Oligonucleotiden in Lösung oder vorzugsweise an fester Phase, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines automatischen Synthesegeräts. Der Aufbau des Oligomers der Formel I kann schrittweise erfolgen, indem sukzessive eine PNA-Einheit bzw. DNA-Einheit mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert werden. Der Aufbau kann aber

auch fragmentweise erfolgen, wobei die Fragmente zuerst als Polyamid- bzw. Oligonucleotid-Strukturen synthetisiert werden, welche dann zum Polyamid-Oligonucleotid der Formel I verknüpft werden. Es können jedoch auch Bausteine aus PNA und Nucleotid eingesetzt werden, vorzugsweise Dimere, die dann nach den Methoden der Nucleotid-Chemie oder Peptid-Chemie zu Polyamid-OligonucleotidDerivaten aufgebaut werden.

Der Aufbau des Oligonucleotid-Teils erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren wie der Triester-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder Phosphoramidit-Methode, bevorzugt nach der Standard-Phosphoramidit Chemie nach Caruthers (M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)). Die Synthese des Polyamid-Teils kann nach den dem Fachmann bekannten Methoden der Peptid-Chemie erfolgen. Falls Oligonucleotid-Teil und Polyamid-Teil nicht separat synthetisiert und nachfolgend verbunden werden, müssen die zum Aufbau der Oligonucleotid- und Polyamid-Struktur verwendeten Verfahren miteinander kompatibel sein, wobei eine bevorzugte Ausführungsform zur Synthese des Polyamid-Teils in der gleichzeitig eingereichten Anmeldung mit dem Titel "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe (HOE 94/F 060, DE-P 44 08 531.1) beschrieben ist.

Je nachdem, ob q, r, s und t gleich 1 oder Null sind, erfolgt die Synthese beginnend mit dem Oligonucleotid- oder mit dem Polyamid-Teil. Die Synthese von Verbindungen der Formel I, deren Oligonucleotid-Teil am 3'- und/oder am 5'-Ende modifiziert sind, erfolgt bezüglich dieser Modifikationen nach den in EP-A 0 552 766 (HOE 92/F 012) beschriebenen Verfahren (vgl. Syntheschema für DNA). Die Synthese von Verbindungen der Formel I erfolgt bezüglich des Polyamid-Teils nach dem in der gleichzeitig eingereichten Anmeldung mit dem Titel "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe (HOE 94/ F 060, DE-P 44 08 531.1) beschriebenen Verfahren (vgl. Syntheschema für PNA).

Syntheschema für DNA

[Ankergruppe]-[Polymer]

1. ↓ Aufkupplung von PG-(Nu')-aktiv

PG-(Nu')-[Ankergruppe]-[Polymer]

2. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG

H-(Nu')-[Ankergruppe]-[Polymer]

3. ↓ Wiederholung der Schritte 1 und 2 (n-1)-mal

H-(Nu')_n-[Ankergruppe]-[Polymer]

4. ↓ Aufkupplung von R⁰-V-aktiv

R⁰-V-(Nu')_n-[Ankergruppe]-[Polymer]

5. ↓ Abspaltung von Polymer und Schutzgruppen

R⁰-V-(Nu)_n

Syntheschema für PNA

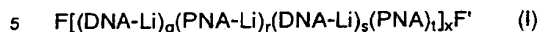
- [Ankergruppe]-[Polymer]
- 5 1. ↓ Aufkupplung von PG-(Q')-OH
 PG-(Q')-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 10 2. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG
 H-(Q')-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 15 3. ↓ Wiederholung der Schritte 1 und 2 (l-1)-mal
 H-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 20 4. ↓ Aufkupplung von PG-[B'/X]-OH
 PG-[B'/X]-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 25 5. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG
 H-[B'/X]-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 30 6. ↓ Wiederholung der Schritte 4 und 5 (n-1)-mal
 H-[B'/X]_n-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 35 7. ↓ Aufkupplung von PG-(A')-OH
 PG-(A')-[B'/X]_n-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 40 8. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG
 H-(A')-[B'/X]_n-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 45 9. ↓ Wiederholung der Schritte 7 und 8 (k-1)-mal
 H-(A')_k-[B'/X]_n-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 - 50 10. ↓ Aufkupplung der Gruppe R⁰
 R⁰-(A')_k-[B'/X]_n-(Q')_l-[Ankergruppe]-[Polymer]
 11. ↓ Abspaltung von Polymer und Schutzgruppen
 R⁰-(A)_k-[B/X]_n-(Q)_l-Q⁰

Darin bedeuten:

- PG Schutzgruppe, bevorzugt eine gegen schwache Säure labile Schutzgruppe;
 55 Nu' Nucleotid-Einheit, deren exocyclische Aminogruppe durch eine geeignete Schutzgruppe geschützt ist;
 Nu'-aktiv ein in der Nucleotidchemie übliches aktiviertes Derivat, wie z.B.
 von einem Phosphoramidit, einem Phosphordiester oder einem H-Phosphonat; A', B' und Q' stehen für die

gegebenenfalls geschützten Formen von A, B und Q.

Syntheschema für PNA/DNA-Hybride der Formel I



Für $q=r=s=t=1$ und $x=1$ gilt folgender Syntheseablauf:

1. ↓ Synthese der Endgruppe F'; ggf. Konjugation auf Polymer
PG-F'
2. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG
H-F'
3. ↓ Konjugation der Polyamidstruktur
PNA-F'
4. ↓ Aufkupplung eines Linkers
Li-PNA-F'
5. ↓ Konjugation der Nucleotidstruktur
DNA-Li-PNA-F'
6. ↓ Aufkupplung eines Linkers
Li-DNA-Li-PNA-F'
7. ↓ Wiederholung der Schritte 3 bis 5
DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F'
8. ↓ Aufkupplung der Endgruppe F
F-DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F'

Die Aufkupplung des Linkerbausteins kann entfallen, sofern sich entsprechende Übergänge in den PNA- oder DNA-Bausteinen befinden.

Zur Verdeutlichung ist ein Syntheschema für PNA/DNA-Hybride der Formel I gezeigt, das die Herstellung eines Hybrid-Oligomers, in dem $q=r=s=t=1$ und $x=1$ sind, beispielhaft erläutert. Zunächst wird die Endgruppe F nach bekannten Verfahren synthetisiert und im Falle der Festphasen-Synthese auf einen polymeren Träger gekuppelt (Schritt 1). Nach Abspaltung der Schutzgruppe PG (Schritt 2), die bevorzugt im schwach sauren Medium erfolgt, werden die Polyamid-Bausteine bis zur gewünschten Länge des PNA-Teils aufgekuppelt (Schritt 3). Als Übergang zum DNA-Teil kann nun die Anknüpfung einer Linker-Einheit (Schritt 4) erfolgen. Anschließend erfolgt die Konjugation der Nucleotidstruktur durch sukzessive Ankondensation der Nucleotid-Bausteine (Schritt 5), bevorzugt nach der bekannten Phosphoramidit-Methode.

Nach Ankondensation eines Linkers (Schritt 6), der den Übergang von DNA zu PNA ermöglicht, wird wiederum eine Polyamidstruktur aufgebaut. Einführung eines Linkers, der den Übergang von PNA nach DNA ermöglicht, Konjugation einer weiteren DNA-Struktur (Schritt 7) und abschließende Aufkupplung der Endgruppe F (Schritt 8) ergeben das Hybridmolekül [F-DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F']. Die Linkerbausteine können hierbei auch Nucleobasen beinhalten.

Zur Synthese eines Hybrids F-DNA-Li-PNA-Li-F' ($q=r=1$, $s=t=Null$) werden beispielsweise erst die

Schritte 1-5 durchgeführt und die Synthese dann mit Schritt 8 abgeschlossen.

Zur Synthese eines Hybrids F-PNA-Li-DNA-F' ($r=s=1$, $q=t=\text{Null}$) werden beispielsweise erst die Schritte 1-2 durchgeführt, danach folgen die Schritte 5-6, gefolgt von Schritt 3 und Abschluß der Synthese mit Schritt 8.

- 5 Zur Synthese eines Hybrids F-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F' ($r=s=t=1$, $q=\text{Null}$) beginnt die Synthese mit den Schritten 1-6. Nach Wiederholung des Schrittes 3 wird die Synthese mit Schritt 8 abgeschlossen.

Ist x in Formel I >1 , dann müssen die Schritte 2-7 gegebenenfalls wiederholt werden. Nach Aufbau der polymeren Ketten müssen die PNA/DNA-Hybride im Falle der Festphasensynthese vom Träger abgespalten werden und gegebenenfalls die Schutzgruppen an den Basen, Aminosäure-Seitenketten und Endgruppen abgespalten werden.

- 10 PNA- und DNA-Teil können aber auch getrennt nach bekannten Methoden synthetisiert und anschließend über entsprechende Aktivierung mindestens einer Komponente miteinander gekuppelt werden. Die Aktivierung des PNA-Teils erfolgt bevorzugt über die Carbonsäure-Gruppe, beispielsweise als Aktivester oder Isothiocyanat, die dann mit reaktiven Gruppen im DNA-Teil, vorzugsweise einer Aminofunktion in Reaktion
15 gebracht werden. Die Aktivierung des DNA-Teils erfolgt beispielsweise in Form einer an sich bekannten Bromcyan-Kondensation, bei der die aktivierte Phosphatfunktion mit einer reaktiven Gruppe im PNA-Teil, bevorzugt einer Aminofunktion zur Reaktion gebracht wird.

- Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Oligomeren der Formel Ia und Ib im Vergleich zu den reinen PNA's eine stark erhöhte zelluläre Aufnahme besitzen. Diese verbesserte Zellaufnahme ist ganz
20 entscheidend, da Antisense- oder Triplex-bildende Oligomere nur dann wirken können, wenn sie effektiv in Zellen aufgenommen werden. Ihr Hybridisationsverhalten ist ebenfalls günstiger als bei reinen PNA's, da sie bevorzugt zur antiparallelen Duplexbildung führen.

- Im Vergleich zu normalen Oligonucleotiden besitzen sie eine verbesserte Nucleasestabilität, was sich in einer erhöhten biologischen Aktivität äußert. Die Bindungsaffinität an komplementäre Nucleinsäuren ist
25 besser als die anderer nucleasestabiler Oligonucleotide, wie z.B. Phosphorothioate oder Methylphosphonate. Die Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Verbindungen ist beim Vergleich mit natürlichen Oligonucleotiden, die unter Serum-Bedingungen rasch abgebaut werden, mindestens gleich gut oder meistens jedoch besser. Die Erhöhung der Bindungsaffinität ist abhängig von der Länge des PNA-Teils. Reine PNA's zeigten in den Zellkulturversuchen bei Konzentrationen von $> 5 \mu\text{M}$ stark cytotoxische Wirkung, während
30 die erfindungsgemäßen Verbindungen die Zellen nicht schädigten. Es wurde ferner gefunden, daß Verbindungen der Formel I in Abhängigkeit von der Basenfolge des PNA- und DNA-Teils die Expression spezifischer Gene, beispielsweise von Enzymen, Rezeptoren oder Wachstumsfaktoren in Zellkultur und in ausgewählten Beispielen im Tiermodell hemmen.

- Weitere Vorteile der PNA/DNA-Oligomeren bzw. PNA/RNA-Oligomeren bestehen in der Möglichkeit der
35 Stimulierung zellulärer Endonucleasen wie beispielsweise RNase H und RNase L. Im Gegensatz zu PNA's können die erfindungsgemäßen PNA-DNA-Chimären, die einige Desoxyribonucleotid-Einheiten aufweisen, nach Anbindung an die komplementäre Target-RNA diese in sequenzspezifischer Weise durch Induktion der zellulären RNase H spalten.

- Eine besondere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Oligomeren sind weiterhin solche, die aus PNA-
40 und einem 2'5'-verknüpften Oligoadenylat-Teil, vorzugsweise Tetraadenylat oder dessen Cordycepin-Analogon aufgebaut sind, und die die zelluläre RNase L aktivieren.

- Ganz generell erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel I als therapeutisch wirksame Bestandteile eines Arzneimittels. Als therapeutisch wirksame Polyamid-Oligonucleotid-Derivate versteht man im allgemeinen Antisense Oligonucleotide, Tripelhelix-bildende-Oligonucleotide, Aptamere oder Ribozyme, insbesondere Antisense-Oligonucleotide.
45

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden.

- Erfindungsgemäße Antisense Polyamid-Oligonucleotide-Derivate, die gegen solche Targets wirksam
50 sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz. Die Länge und Position des PNA- und DNA-Teils kann in diesen Sequenzen zur Erzielung optimaler Eigenschaften entsprechend variiert werden.

a) gegen HIV, z. B.

5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G -3' oder

(I)

- 55 5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3' oder

(II)

5'-G T C G A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G A T A A-3' oder

(III)

5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA-3' oder

(IV)

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCTGCGCA oder

(VI)

5 b) gegen HSV-1, z.B.

5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3'

(VII)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Beispielsweise können dabei Polyamid-Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

- 1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120
- 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl
- 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms
- 4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin,

Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'

(VIII)

b) bFGF, z.B.

25 5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

(XXX)

c) c-myc, z.B.

5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'

(IX)

30 5'-AAGTTGAGGGGCAT-3'

(X)

d) c-myb, z.B.

5'-GTGCCGGGGTCTTCTGGGC-3'

(XI)

35 e) c-fos, z.B.

5'-GGAGAACATCATGGTTCGAAAG-3'

(XII)

5'-CCCGAGAACATCATGGTTCGAAAG-3'

(XIII)

40 5'-GGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

(XIV)

f) p120, z.B.

5'-CACCCGCCCTTGGCCTCCCAAC-3'

(XV)

45 g) EGF-Rezeptor, z.B.

5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'

(XVI)

5'-GGCAAACCTTTCTTTCTCTCC-3'

(XVII)

50 h) p53 Tumorsuppressor, z. B.

5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'

(XVIII)

5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'r

(XIX)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotid-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) VLA-4, z.B.

5'-G C A G T A A G C A T C C A T A T C -3' oder

(XX)

b) ICAM, z.B.

5'-C C C C C A C C A C T T C C C C T C T C -3'

(XXI)

5'-C T C C C C C A C C A C T T C C C C T C -3'

(XXII)

5'-G C T G G G A G C C A T A G C G A G G -3'

(XXIII)

c) ELAM-1, z. B.

5'-A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G -3'

(XXIV)

5'-C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C -3'

(XXV)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Beispielsweise können dabei Polyamid-Oligonucleotid-Sequenzen

zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF und TGF- β .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb

5'-G T G T C G G G G T C T C C G G G C -3'

(XXVI)

b) c-myc

5'-C A C G T T G A G G G G C A T -3'

(XXVII)

c) cdc2-Kinase

5'-G T C T T C C A T A G T T A C T C A -3'

(XXVIII)

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat)

5'-G A T C A G G C G T G C C T C A A A -3'

(XXIX)

Die Arzneimittel können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Der Einschluß der Arzneimittel in Liposomen, die gegebenenfalls weitere Komponenten wie Proteine enthalten, ist eine ebenfalls geeignete Applikationsform. Sie können auch rektal z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talk und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder aber auch Injektionen. Zur Injektion werden die Antisense-Polyamid-Oligonucleotid-Derivate in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert.

Die Antisense-Polyamid-Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systemische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

Ganz generell erstreckt sich die Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel I als DNA-Sonden oder Primer in der DNA-Diagnostik, insbesondere im Sinne der in HOE 92/F 406 (EP-A 0 602 524) genannten Gensonden, und allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

In der DNA-Diagnostik spielen Gensonden, auch DNA-Probes oder Hybridization-Probes genannt, eine große Rolle zum sequenzspezifischen Nachweis bestimmter Gene. Eine Sonde besteht im allgemeinen aus einer Erkennungssequenz und einer geeigneten Markierungsgruppe (Label). Die Spezifität der Bestimmung einer Targetsequenz in einer Analysenprobe mittels Hybridisierung mit einer komplementären Sonde wird durch die Erkennungssequenz und deren chemischer Struktur determiniert. Die PNA's haben gegenüber den Oligonucleotiden natürlicher Struktur den Vorteil, daß sie eine höhere Affinität zur Targetsequenz besitzen. Jedoch ist die Spezifität der Hybridisierung reduziert, da PNA's im Gegensatz zu natürlicher DNA sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Orientierung an einzelsträngige Nucleinsäuren binden können. Die erfindungsgemäßen PNA/DNA-Oligomeren zeigen ebenfalls eine erhöhte Bindungsaffinität, binden jedoch stark bevorzugt in der gewünschten antiparallelen Orientierung.

Durch entsprechende Auswahl des PNA- bzw. DNA-Teils in einer Sonde kann zudem das Differenzierungsvermögen positiv beeinflußt werden, da eine Basenmißpaarung im PNA-Teil zu einer stärkeren Depression der Schmelztemperatur eines Hybrids führt als eine Basenmißpaarung im DNA-Teil. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die Differenzierung bei Punktmutationen wie sie beispielsweise beim Übergang von Protoonkogenen in die entsprechenden Onkogene (pathogener Zustand) vorkommen. Der Vorteil der besseren Diskriminierung zwischen pathogenem und nichtpathogenem Zustand läßt sich auch in Form der Primer-Eigenschaft der erfindungsgemäßen PNA/DNA-Oligomeren nutzen, sofern diese eine freie 3'-Hydroxyfunktion im DNA-Teil besitzen. PNA's als solche besitzen keine Primer-Funktion für Polymerasen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß bereits eine Nucleosid-Einheit am Ende eines PNA/DNA-Oligomers ausreicht, um die DNA-Polymerasereaktion, beispielsweise mit Hilfe der DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) zu initiieren. Je nach Beschaffenheit des PNA/DNA-Primers und der Art des Templats, an welches der Primer in sequenzspezifischer Weise hybridisiert, können verschiedene Polymerasen eingesetzt werden. Diese sind im allgemeinen kommerziell zugänglich, wie beispielsweise Taq-Polymerase, Klenow-Polymerase oder Reverse Transkriptase.

Ein weiterer Vorteil gegenüber der Verwendung natürlicher Oligonucleotid-Primer besteht darin, daß der mit Hilfe des PNA/DNA-Primers kodierte Nucleinsäurestrang, der den PNA-Teil am 5'-Ende enthält, gegen 5'-Exonucleasen stabil ist. Somit können alle natürlichen DNA- bzw. RNA-Sequenzen im Reaktionsgemisch durch 5'Exonucleasen abgebaut werden, ohne daß der PNA-haltige Strang angegriffen wird.

Ein weiterer Vorteil der PNA/DNA-Oligomeren besteht darin, daß man damit auch andere biochemische Reaktionen am DNA-Teil durchführen kann, welche bei PNA's selbst nicht möglich sind. Beispiele für solche Reaktionen sind das "3'-Tailing" mit 3'-terminaler Transferase, der Restriktionsenzymverdau im DNA-Doppelstrang-Bereich sowie Ligase-Reaktionen. Beispielsweise kann ein (PNA)-(DNA)-OH Oligomer mit freier 3'-Hydroxygruppe mit einem zweiten p-(DNA)-(PNA)-Oligomer, das am 5'-Ende ein Nucleosid-5'-Phosphat enthält, nach Hybridisierung an eine komplementäre DNA-Hilfssequenz natürlichen Ursprungs in Gegenwart einer DNA-Ligase verknüpft werden.

Weiterhin lassen sich (DNA)-(PNA)-(DNA) Oligomere in Gene einbauen, was mit PNA's zur Zeit nicht möglich ist.

Die Anknüpfung von Markierungsgruppen an PNA/DNA-Oligomere erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie sie für Oligonucleotide oder Peptide beschrieben sind. Die Art der Markierungsgruppe kann breit variiert werden und richtet sich im wesentlichen nach der Art des verwendeten Assays. Bekannte Ausführungsformen von Gensonden-Assays sind "Hybridization Protection"-, "Energy-Transfer"- und "Kissing Probes"-Assay. PNA/DNA-Oligomere eignen sich zudem besonders gut für einen "Strand Displacement"-Assay. In vielen Fällen ist die Abtrennung des gebildeten Hybrids von überschüssiger Sonde mit Hilfe von Magnetpartikeln von Vorteil. Die Stabilität der erfindungsgemäßen PNA/DNA-Gensonden ist höher als die herkömmlicher DNA-Sonden.

"Polymerase Chain Reaction" (PCR) und "Ligase Chain Reaction" (LCR) sind Techniken zur Targetamplifikation, in welche die erfindungsgemäßen Oligomeren ebenfalls als Primer eingesetzt werden können. Besonders vorteilhaft lassen sich die PNA/DNA-Oligomeren als Gensonden nach dem "Christmas tree"-Prinzip verwenden, da hierbei die PNA/DNA-Sonden kürzer sein können als entsprechende DNA-Sonden.

Beispiele:

Die für Aminosäuren verwendeten Abkürzungen entsprechen dem in der Peptidchemie üblichen drei Buchstaben-Code wie er in Europ. J. Biochem. 138, 9 (1984) beschrieben ist. Weitere verwendete Abkürzungen sind nachfolgend aufgelistet.

5	Aeg	N-(2-Aminoethyl)glycyl, -NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
	Aeg(a ^{MeOBz})	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N ⁶ -4-methoxybenzoyl)-adenosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(c ^{Bz})	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N ⁴ -benzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(c ^{MeOBz})	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N ⁴ -4-methoxybenzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
10	Aeg(c ^{tBuBz})	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N ⁴ -4-tert.butylbenzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(g ^{iBu})	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N ² -isobutanoyl)-guanosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(g ^{2-Ac,4-Dpc})	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N ² -acetyl-O ⁴ -diphenylcarbamoyl)guanosyl)glycyl
	Aeg(t)	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Bnpeoc	2,2-[Bis(4-nitrophenyl)]-ethoxycarbonyl
15	Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
	BOI	2-(Benzotriazol-1-yl)oxy-1,3-dimethyl-imidazolidinium-hexafluorphosphat
	BOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorphosphat
	BroP	Brom-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorphosphat
	BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
20	But	tert.-Butyl
	Bz	Benzoyl
	Bzl	Benzyl
	Cl-Z	4-Chlor-benzyloxycarbonyl
	CPG	Controlled Pore Glas
25	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
	DCM	Dichlormethan
	Ddz	3,5-Dimethoxyphenyl-2-propyl-2-oxycarbonyl
	DMF	Dimethylformamid
	Dmt	Di-(4-methoxyphenyl)phenylmethyl,
30	Dnpeoc	2-(2,4-Dinitrophenyl)-ethoxycarbonyl
	Dpc	Diphenylcarbamoyl
	FAM	Fluorescein-Rest
	Fm	9-Fluorenylmethyl
	Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
35	H-Aeg-OH	N-(2-Aminoethyl)glycin
	HAPyU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetramethylen)uronium-hexafluorphosphat
	HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
	HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
40	HONSu	N-Hydroxysuccinimid
	HOObt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrobenzotriazin
	iBu	Isobutanoyl
	MeOBz	4-Methoxybenzoyl
	Mmt	4-Methoxytriphenylmethyl
45	Moz	4-Methoxybenzyloxycarbonyl
	MSNT	2,4,6-Mesitylsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid
	Mtt	4-Methylphenyl)diphenylmethyl
	NBA	Nitrobenzylalkohol
	NMP	N-Methylpyrrolidin
50	Obg	N-(4-Oxybutyl)glycyl, -O-(CH ₂) ₄ -NH-CH ₂ -CO-
	Obg(t)	N-(4-Oxybutyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Oeg	N-(2-Oxyethyl)glycyl, -O-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
	Oeg(t)	N-(2-Oxyethyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Opeg	N-(5-Oxypentyl)glycyl, -O-(CH ₂) ₅ -NH-CH ₂ -CO-
55	Opeg(t)	N-(5-Oxypentyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Oprg	N-(3-Oxypropyl)glycyl, -O-(CH ₂) ₃ -NH-CH ₂ -CO-
	Oprg(t)	N-(3-Oxypropyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Pixyl	9-(9-Phenyl)xanthenyl

	PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
	PyBroP	Brom-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
	TAPipU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(pentamethylen)uronium-tetrafluoroborat
	TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
5	tBu	tert.-Butyl
	tBuBz	4-tert. Butylbenzoyl
	TDBTU	O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TDO	2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid
10	Teg	N-(2-Thioethyl)glycyl, -S-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
	Teg(t)	N-(2-Thioethyl)-N-((1-thyminy)l)acetyl-glycyl
	TFA	Trifluoressigsäure
	THF	Tetrahydrofuran
	TNTU	O-[(5-Norbornen-2,3-dicarboximido]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
15	TOTU	O-[(Cyano(ethoxycarbonyl)methylen)amino]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TPTU	O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-1,1,3,3'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	Trt	Trityl
	TSTU	O-(N-Succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
20	Z	Benzyloxycarbonyl
	MS(ES ⁺)	Elektrospray Massenspektrum (Positiv Ion)
	MS(ES ⁻)	Elektrospray Massenspektrum (Negativ Ion)
	MS(DCI)	Desorption Chemical Ionisation Massenspektrum
	MS(FAB)	Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrum

Beispiel 1

1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexanMmt-hex

30 6-Aminohexan-1-ol (1g; 8.55mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (7ml) gelöst und mit Triethylamin (0.2ml) versetzt. Zu dieser Lösung gibt man innerhalb von 45 Minuten eine Lösung von (4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyl chlorid (2.5g; 8.12mmol) in wasserfreiem Pyridin (9ml). Die Reaktionslösung wird 30 Minuten bei 22 °C weitergerührt und durch Zugabe von Methanol (3 ml) gestoppt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt, der erhaltene Rückstand zur Entfernung des Pyridins dreimal mit Toluol

35 koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und diese Lösung nacheinander mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung, mit Wasser und einer gesättigten Kaliumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatographie mit Heptan:Ethylacetat:Triethylamin/49.5:49.5:1 gereinigt.

Ausbeute: 1.64g

40 MS (FAB,NBA/LiCl) 396.3 (M + Li)⁺, 390.3 (M + H)⁺, 273.2 (Mmt)⁺

R_f 0.44 (Heptan:Ethylacetat = 1:1),

Beispiel 2

45 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat Mmt-hex-succ

1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexan (1.00g; 2.57mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (10ml) gelöst. Zu dieser Lösung gibt man Bernsteinsäureanhydrid (0.257g; 2.57mmol) and 4-Dimethylaminopyridin (31.3mg; 0.257mmol). Nach 3 Stunden Rühren bei 22 °C gibt man weiteres Bernsteinsäureanhydrid (25.7mg; 0.257mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (62.6mg; 0.56mmol) zu und erwärmt diese Lösung 6 Stunden lang auf 50 °C. Nach weiteren 16 Stunden bei 22 °C wird eingeeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und die erhaltene Lösung mit eiskalter 5%-iger wässriger Zitronensäure gewaschen. Nach Trocknen der org. Phase (Na₂SO₄) wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rückstands durch Kieselgelchromatographie mit 50% CH₂Cl₂/1% Triethylamin in Ethylacetat und dann mit 5% Methanol/1% Triethylamin in Dichlormethan ergibt die gewünschte

50 Verbindung als farbloses Öl.

MS (ES⁻) 978.0 (2M-H)⁻, 488.3 (M-H)⁻R_f 0.30 (CH₂Cl₂:EthylAcetat = 1:1).

Beispiel 3

6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamido-Tentagel (Mmt-hex-succ-Tentagel)

- Die Aminoform von Tentagel^R (Rapp Polymere) (0.5g; 0.11 mmol Aminogruppen) läßt man 10 Minuten in 4-Ethylmorpholin (0.1ml) und DMF (5ml) quellen. Dann gibt man eine Lösung von 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (97.4mg; 0.165mmol), 4-Ethylmorpholin (15.9mg; 0.138mmol; 17.4ml) und TBTU (52.9mg; 0.165mmol) in DMF (3ml) zu und schüttelt die Suspension 16 Stunden lang bei 22°C. Der derivatisierte Tentagel-Träger wird abfiltriert und nacheinander mit DMF (3x3ml), CH₂Cl₂ (3x1ml) and Diethylether (3x1ml) gewaschen und getrocknet. Nicht reagierte Aminofunktionen werden durch 1-stündige Behandlung mit Acetanhydrid/Lutidin/1-methylimidazol in THF (1ml) blockiert. Der fertige Träger wird mit CH₂Cl₂ (3x1ml) und Diethylether (3x1ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung bezogen auf die eingeführte Monomethoxytritylfunktion beträgt 168mmolg⁻¹.

15 Beispiel 4

6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamidopropyl-Controlled-pore glass.
(Mmt-hex-succ-CPG)

- Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 3 beschrieben ausgehend von Aminopropyl-CPG (Firma Fluka) (550Å; 1.0g;) und 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (48.7mg; 0.082mmol), 4-Ethylmorpholin (7.6ml) und TBTU (26.4mg; 0.082mmol) in DMF (3ml). Die Beladung des Mmt-hex-succCPG beträgt 91 mmolg⁻¹.

25 Beispiel 5

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-(N⁴-(4-tert-butylbenzoyl)-cytosyl)acetyl) glycin
(Mmt-Aeg(c^{tBuBz})-OH)

- 1.63 g (2.28 mMol) N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-(N⁴-(4-ter t-butylbenzoyl)-cytosyl)acetyl) glycin-methylester wurden in einer Mischung aus 10 ml Dioxan und 1 ml Wasser gelöst und bei 0°C unter Rühren tropfenweise mit 4.56 ml 1N NaOH versetzt. Nach 2h wurde durch tropfenweise Zugabe von 1N KHSO₄ der pH auf 5 gestellt, von ausgefallenen Salzen abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingedampft und der Rückstand zweimal mit Methanol und Dichlormethan koevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel mit einem Gradienten von 2-10% Methanol und 1 % Triethylamin in Dichlormethan chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Durch Koevaporation mit Pyridin und anschließend Toluol wurde noch vorhandenes überschüssiges Triethylamin entfernt. Man erhielt 0.831 g Produkt als fast weißen Schaum. Electrospray MS (Negativ-Ion) 700.7 (M-H)⁻.
- R₁ 0.28 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1), 0.63 (CH₂Cl₂:MeOH/7:3).

Beispiel 6

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-thyminy)acetyl) glycin (Mmt-Aeg(t))-OH.

- Das Produkt aus der obigen Reaktion wurde in einer Mischung aus 10 ml Dioxan und 2 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und tropfenweise 1 N Natronlauge zugegeben bis ein pH-Wert von 11 erreicht war. Nach 2 h Reaktionszeit war die Reaktion beendet und die Lösung wurde durch vorsichtige Zugabe von 2 N KHSO₄-Lösung auf pH 5 gestellt. Die Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel mit einem Gradienten von 5-10% Methanol und 1 % Triethylamin in Dichlormethan chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Durch Koevaporation mit Pyridin und anschließend Toluol wurde noch vorhandenes überschüssiges Triethylamin entfernt. Man erhielt 1.065 g Produkt als farblosen Schaum.
- Elektrospray MS (Negativ-Ion) 1112.0 (12M-H)⁻, 555.3 (M-H)⁻
R₁ 0.28 (CH₂Cl₂:MeOH/8:2)

Beispiel 7

N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N²-(isobutanoyl)guanosyl)acetyl)glycin
(Mmt-Aeg(g^{IBu})-OH)

5

N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N²-(isobutanoyl)guanosyl)acetyl)-
glycinmethylester (1.15g; 1.72mmol) wird in Dioxan (10ml) gelöst und über einen Zeitraum von 2.5h bei
0 °C tropfenweise mit 1M wäßriger Natronlauge (10.32ml) in 5 Teilen versetzt. Nach weiteren 2h Reaktions-
zeit bei Raumtemperatur wird die Lösung durch tropfenweise Zugabe von 2M wäßriger Kaliumhydrogensul-
fatlösung auf pH5 gestellt. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen.
Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand je zweimal mit
Ethanol sowie Dichlormethan:Methanol 1/1 koevaporiert. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie
an Kieselgel durch Elution mit einem Gradienten von 10-20% Methanol in Dichlormethan (mit 1%
Triethylamin). Man erhält das Produkt als weißen Schaum.
Ausbeute: 1.229g
ESMS (Negative-Ion): 650.3(M-H)⁻
R_f 0.25 (Dichlormethan:Methanol/8:2)

15

Beispiel 8

20

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N⁶-(4-methoxybenzoyl)adenosyl)acetyl) glycin
(Mmt-Aeg(a^{MeOBz})-OH)

25

N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N⁶-(4-methoxybenzoyl)adenosyl)acetyl) glycin-
methyl ester (1.70g; 2.38mmol)
wird in Dioxan (10ml) gelöst und über einen Zeitraum von 2.5h bei 0 °C tropfenweise mit 1M wäßriger
Natronlauge (10.32ml) in 5 Teilen versetzt. Nach weiteren 2h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird die
Lösung durch tropfenweise Zugabe von 2M wäßriger Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH5 gestellt. Die
ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen.
Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand je zweimal mit
Ethanol sowie Dichlormethan:Methanol 1/1 koevaporiert. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatogra-
phie an Kieselgel durch Elution mit einem Gradienten von 10-20% Methanol in Dichlormethan (mit 1%
Triethylamin). Man erhält das Produkt als weißen Schaum.
Ausbeute: 1.619g
ESMS (Negative-Ion): 698.3(M-H)⁻
R_f 0.10 (Dichlormethan:Methanol/8:2)

35

Beispiel 9

40

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyloxy)ethyl-N-((1-thyminyl)acetyl) glycin (Mmt-Oeg(t)-OH)

0.5g (1.28mMol) N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyloxy)ethylglycin wurden in 10 ml DMF suspen-
diert und 0.47 ml (1.92 mMol) BSA wurden tropfenweise zugegeben. Nacheinander wurden dann 0.7 ml (5.1
mMol) Triethylamin und 0.26 g (1.28 mMol) Chlorcarboxymethylthymin zugefügt. Die Reaktionsmischung
wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, dann weitere 65 mg (0.32 mMol) Chlorcarboxymethylthymin
zugegeben und noch für 16 h gerührt. Danach zog man das Lösungsmittel im Vakuum ab und reinigte das
Rohprodukt an einer Kieselgelsäule mit einem Gradienten von 5-15% Methanol und 1 % Triethylamin in
Dichlormethan. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeeengt. Das
erhaltene bräunliche Öl wurde in wenig Dichlormethan gelöst und durch Zugabe von Diethylether das
Produkt ausgefällt. Man erhielt das Produkt als fast weißes Pulver.
Ausbeute: 0.219 g
Electrospray MS (Negativ Ion) 556.3 (M-H)⁻
R_f 0.54 (CH₂Cl₂:MeOH/8:2).

50

55

Beispiel 10

4-Nitrophenyl 4-(4, 4'-Dimethoxytrityloxy)-butyrat. Dmt-but-NPE

- 5 Das Natriumsalz der 4-Hydroxybuttersäure (1.26g; 10mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (30ml) gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (3.39g; 3.05mmol) versetzt. Nach 16 Stunden gibt man 4-Nitrophenol (1.39g; 10mmol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (2.06g; 10mmol) zu und rührt bei 22 °C für weitere 48 Stunden. Der abgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird konzentriert und der erhaltene Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird
10 über eine Kieselgelsäule gereinigt (10-50% Ethylacetat und 1 % Triethylamin in Petrolether). Die gewünschte Verbindung fällt in Form eines schwach gelblich gefärbten Öls an.

Ausbeute 2.694g.

MS (FAB, MeOH/NBA/LiCl) 534.2 (M + Li)⁺; 527.2 M⁺.

R_f 0.34 (Petrolether:Ethylacetate = 75:25).

15

Beispiel 11

H-Oprg(t)-OH

- 20 3.68 g Thyminylessigsäure werden in 20 ml trockenem DMF gelöst und 6.65 g TOTU und 2.77 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 5.32 g (3-Hydroxypropyl)-glycin, 20 ml Wasser, 20 ml DMF und 5.54 ml Triethylamin zugetropft. Man rührt noch 1 h bei Raumtemperatur nach und engt dann am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5
25 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird mit 250 ml Ethanol versetzt und das dabei ausgefallenen Natriumchlorid abgesaugt. Das Filtrat wird eingeeengt und das Rohprodukt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin gefolgt von Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:4:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am
30 Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.2 g

R_f 0.15 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS(ES⁺): 300.2(M + H)⁺.

35

Beispiel 12

Dmt-Oprg(t)-OH

- 40 3.2 g H-Oprg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 5.93 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0 °C eine Lösung von 7.25 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 20 min zugetropft. Man rührt noch 2 h bei Raumtemperatur nach, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum
45 eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.46 g

R_f 0,28 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

- 50 MS(ES⁺) 602.4(M + H)⁺.

Beispiel 13

H-Obg(t)-OH

55

2.76 g Thyminylessigsäure werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und 4.92 g TOTU und 2.08 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 4.41 g (4-Hydroxybutyl)-glycin, 10 ml Wasser, 10 ml DMF und 4.16 ml

Triethylamin zugetropft. Man rührt noch 3 h bei Raumtemperatur nach und engt das Gemisch am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.7 g

R_f 0.11 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS(ES^+) 314.2(M + H) $^+$.

Beispiel 14

Dmt-Obg(t)-OH

3.6 g H-Obg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 9.5 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0 °C eine Lösung von 15.4 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 15 min zugetropft. Man rührt noch 2 h bei Raumtemperatur nach gibt weitere 40 ml Dichlormethan hinzu, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 15:1:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.45 g

R_f 0.29 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS($ES^+ + LiCl$) 622.3(M + Li) $^+$.

Beispiel 15

H-Opeg(t)-OH

2.76 g Thyminylessigsäure werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und 4.92 g TOTU und 2.08 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 4.83 g (5-Hydroxypentyl)-glycin, 10 ml Wasser, 10 ml DMF und 4.16 ml Triethylamin zugetropft. Man rührt noch 3 h bei Raumtemperatur nach und engt das Gemisch am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.34 g

R_f 0.19 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS(DCl) 328.2(M + H) $^+$.

Beispiel 16

Dmt-Opeg(t)-OH

3.2 g H-Opeg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 6.77 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0 °C eine Lösung von 9.94 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 15 min zugetropft. Man rührt noch 2 h bei Raumtemperatur nach gibt weitere 40 ml Dichlormethan hinzu, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 15:1:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3.6 g

R_f 0,27 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)
 MS(ES⁺ + LiCl): 636.4(M + Li)⁺.

Beispiel 17

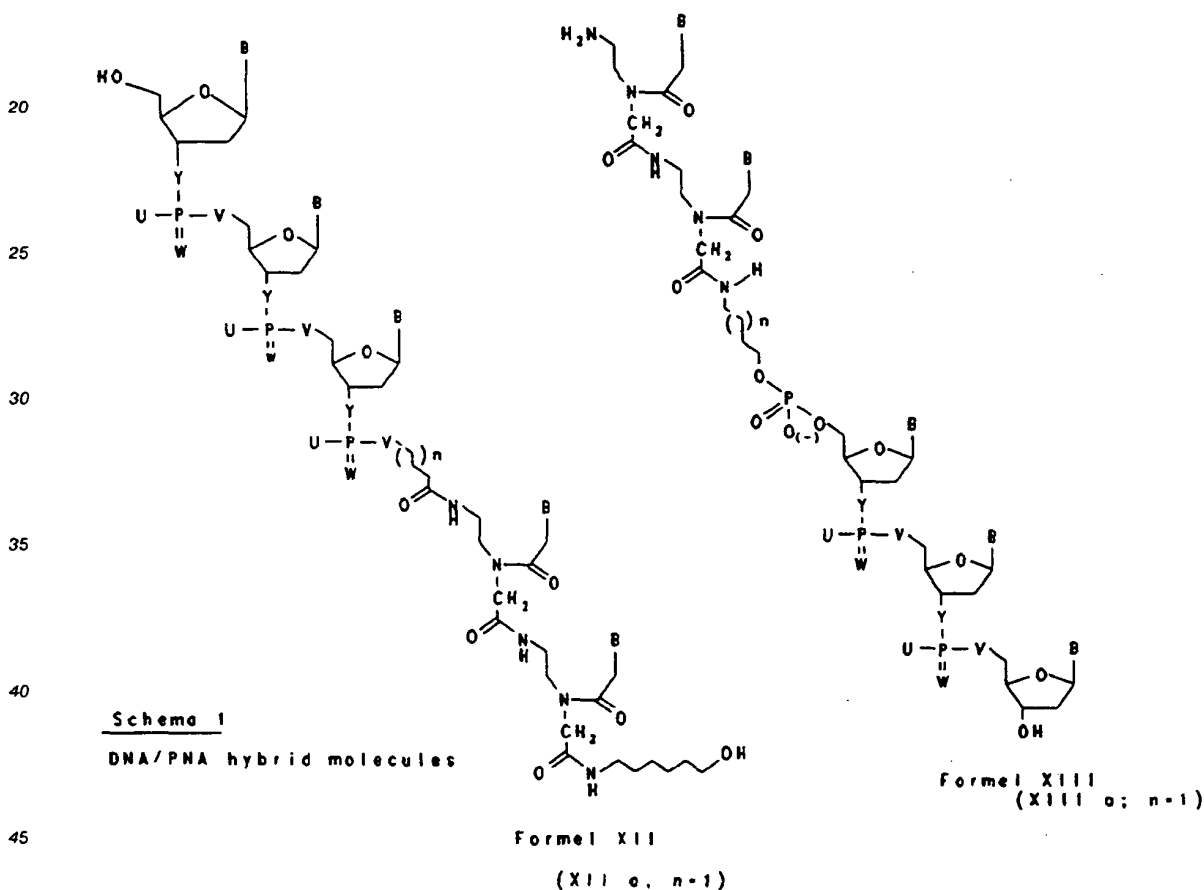
5

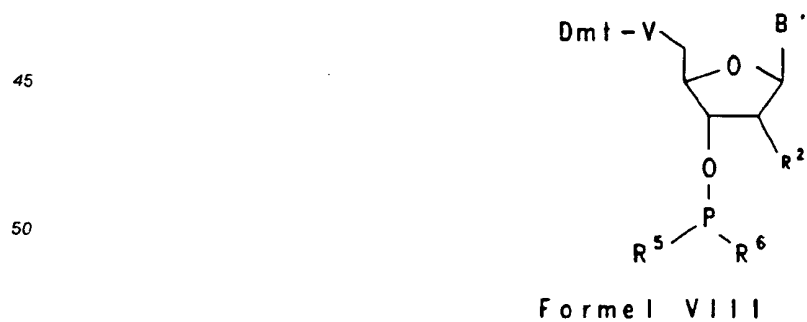
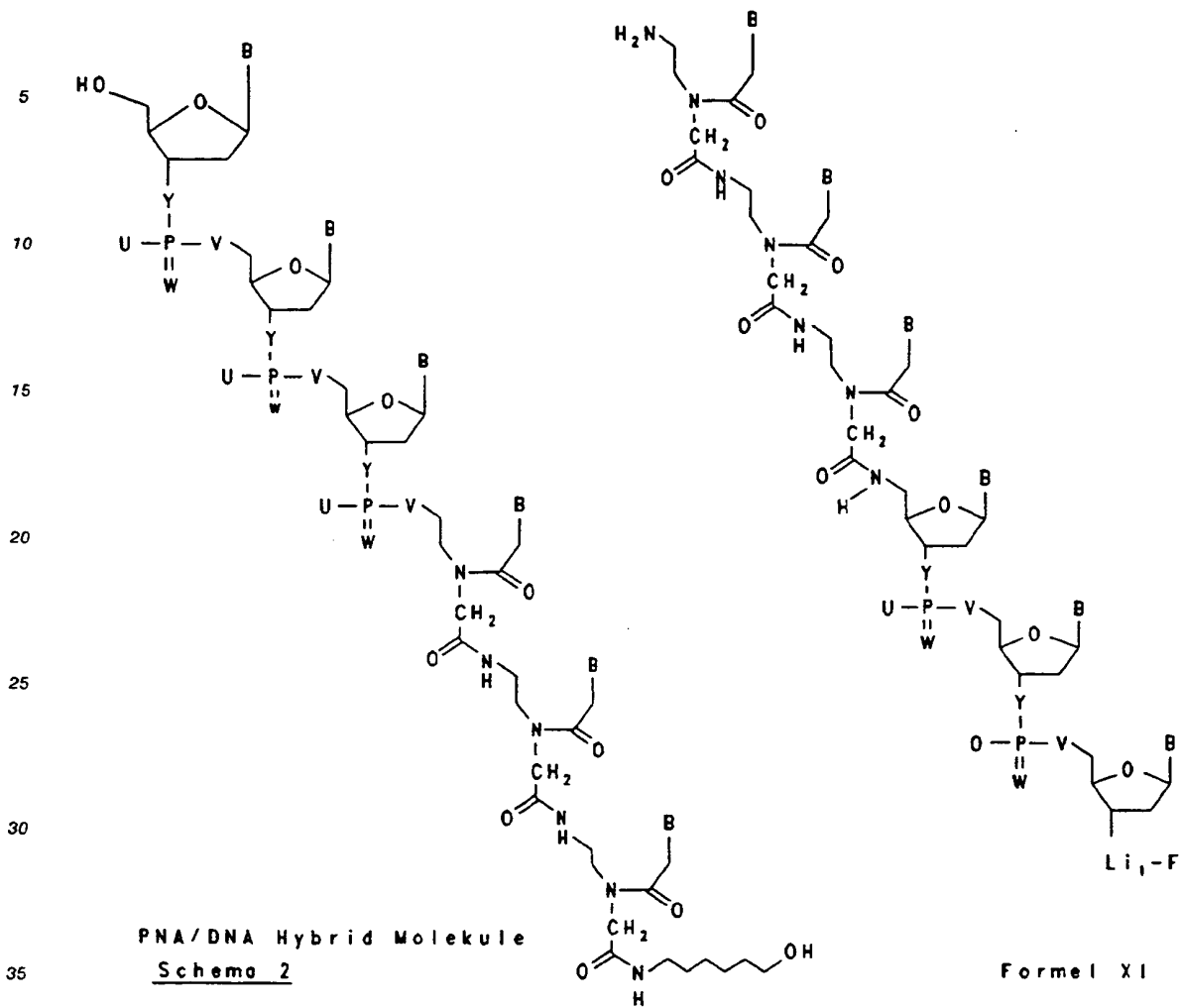
5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex

Die DNA-Sequenz ist in Großbuchstaben, die PNA-Sequenz in Kleinbuchstaben angezeigt (Beispiel für den Strukturtyp XIIIa in Schema 1).

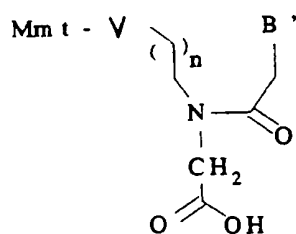
10 Die Synthese der PNA's erfolgt beispielsweise an einem Ecosyn D-300 DNA Synthesizer (Fa. Eppendorf/Biotronik, Maintal) oder einem ABI 380B DNA Synthesizer (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Synthese des DNA-Teils wird im Prinzip nach der Standard Phosphoramidit-Chemie und den kommerziell erhältlichen Synthesesyklen durchgeführt. Zur Synthese des PNA-Teils werden die Methoden der Peptid-Synthese, wie nachfolgend erläutert, an die DNA-Synthesesyklen angeglichen.

15



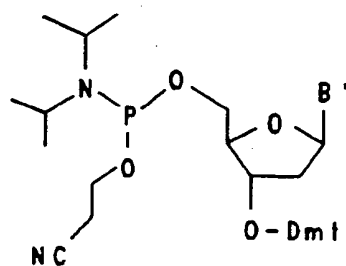


	R ⁵	R ⁶	R ²	V
VIII a	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII b	CH ₃	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII c	C ₆ H ₅	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII d	C ₆ H ₅ -C(O)-S(CH ₂) ₂ -S	-N-pyrrolidin-1-yl	H	O
VIII e	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	OCH ₃	O
VIII f	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	NH

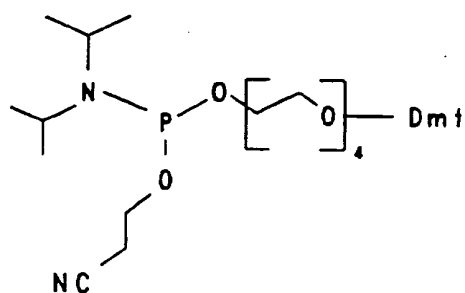


Formel IX (IXa, V=NH; IXb, V=O)

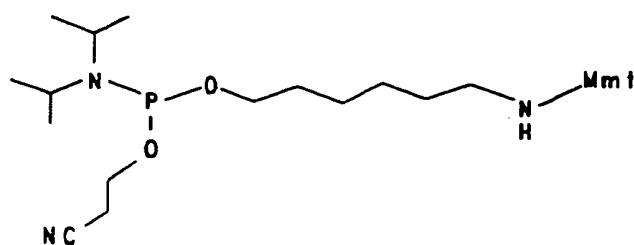
mit $n = 1 - 8$, bevorzugt $1 - 5$,



Formel XIV



Formel XV



Formel XVI

3 μmol des mit Mmt-hex-succ beladenen CPG-Trägers (Beladung 91 $\mu\text{mol/g}$) aus Beispiel 4 werden nacheinander mit folgenden Reagenzien behandelt:

Synthese des PNA-Teils (agtc-hex):

1. Dichlormethan
2. 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
3. Acetonitril abs.
4. 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril (Neutralisation)

5. 0.4 M Lösung von (Mmt-Aeg(c^{tBuBz})-OH) aus Beispiel 5 in Acetonitril:DMF = 9:1 / 0.9 M Lösung von ByBOP in Acetonitril / 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril (10 Minuten Kupplungszeit).
6. Schritt 5 wird viermal wiederholt.
7. Acetonitril
- 5 Die Schritte 1 bis 7, nachfolgend ein PNA-Reaktionszyklus genannt, werden zum Aufbau des PNA-Teils 3-mal wiederholt, wobei in Schritt 5 jeweils der laut Sequenz erforderliche Monomerbaustein aus den Beispielen 5 bis 8 eingesetzt wird.
- Konjugation des Linkers (agtc-hex → (but)-agtc-hex):
8. Schritte 1 bis 4 von oben wiederholen
- 10 9. 4-Nitrophenyl-4-(4, 4'-Dimethoxytrityloxy)-butyrat (105 mg) aus Beispiel 10 und Hydroxybenzotriazol (27 mg) in 2ml NEM in DMF für 15 Stunden
10. Waschen mit DMF
11. Waschen mit Acetonitril
12. Dichlormethan
- 15 Synthese des DNA-Teils
((but)-agtc-hex) → 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex):
13. Acetonitril abs.
14. 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
15. Acetonitril abs.
- 20 16. 10 µmol 5'-O-Dimethoxytritylthymidin-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit und 50 µmol Tetrazol in 0.3 ml Acetonitril abs.
17. Acetonitril
18. 20 % Acetanhydrid in THF mit 40% Lutidin und 10 % Dimethylaminopyridin
19. Acetonitril
- 25 20. Jod (1.3 g in THF/Wasser/Pyridin; 70:20:5 = v:v:v)
- Die Schritte 13 bis 20, nachfolgend ein DNA-Reaktionszyklus genannt, werden zum Aufbau des Nucleotid-Teils 10-mal wiederholt, wobei im Schritt 16 jeweils das der Sequenz entsprechende 5'-O-Dimethoxytrityl-(nucleobase)-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethyl ester-diisopropylamidit eingesetzt wird.
- Nach abgeschlossener Synthese erfolgt die Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe wie in den Schritten
- 30 1 bis 3 beschrieben. Durch 1.5-stündige Behandlung mit Ammoniak wird das Oligomer vom Träger gespalten und zugleich werden die β-Cyanoethyl-Gruppen eliminiert. Zur Abspaltung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird die ammoniakalische Lösung 5 Stunden bei 55 °C gehalten. Vom erhaltenen Rohprodukt (325 OD₂₆₀) an 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex werden 180 OD₂₆₀ durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Nach Entsalzung über eine Biogel^R-Säule (Fa. Biorad) erhält man davon 50
- 35 OD₂₆₀ hochreines Oligomer.

Beispiel 18

- 5'-ATC GTC GTA TT-(Oeg(t))-agtc-hex
40 (Beispiel für den Strukturtyp Xa in Schema 2; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

- Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben, wobei jedoch im Schritt 9 anstelle des Dmt-buttersäure-p-nitrophenylesters der Linkerbaustein Mmt-Oeg(t)-OH aus Beispiel 9 unter den in Schritt 5 beschriebenen Bedingungen gekuppelt wird. Vom erhaltenen Rohprodukt (235 OD₂₆₀) an 5'-ATC GTC GTA
- 45 TT-(Oeg(t))-agtc-hex werden 135 OD₂₆₀ durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Nach Entsalzung über eine Biogel^R-Säule (Fa. Biorad) erhält man davon 20 OD₂₆₀ hochreines Oligomer.

Beispiel 19

- 50 N-ggg g(5'-NH-C)T C₅C₅A₅ TGG GG₅G₅ T (Sequenz gegen HSV-1) (Beispiel für den Strukturtyp XI in Schema 2; s bedeutet eine Phosphorothioat-Brücke; (5'-NH-C) bedeutet einen 5'-Aminocytidylat-Rest; N gleich Aminoterminus)

- Die Synthese erfolgt ausgehend von einem CPG-Träger, welcher 5'-Dmt-thymidin über dessen 3'-Ende gebunden hält. Es wird zunächst wie in Beispiel 17 beschrieben die Synthese des DNA-Teils durchgeführt
- 55 (Schritte 13 bis 20), wobei im Falle der Phosphorothioat-Brücken (s) die Oxidation im Schritt 20 mit Tetraethylthiuramdisulfid (TETD; User Bulletin No. 65 der Firma Applied Biosystems Inc.) erfolgt. Als Linkerbaustein wird ein Dmt-geschützter 5'-Amino-5'-desoxy-cytidylat-3'-phosphoramidit-Baustein der Formel VIII eingesetzt. Danach werden die PNA-Bausteine analog zu den Schritten 1 bis 7 in Beispiel 17

ankondensiert. Nach abgeschlossener Synthese wird das Oligomer durch 1.5-stündige Behandlung mit Ammoniak vom Träger gespalten und zugleich werden die β -Cyanoethyl-Gruppen eliminiert. Zur Abspaltung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird die ammoniakalische Lösung 5 Stunden bei 55 °C gehalten. Erst dann wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22 °C abgespalten. Das Produkt wird mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt und über eine Biogel[®]-Säule (Fa. Biorad) entsalzt.

Beispiel 20

5'-G_{Me}G_{Me}G GCT CCA (Oeg(t))ggg t-hex
(Beispiel für den Strukturtyp Xa in Schema 2; Me bedeutet eine Methylphosphonat-Brücke; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, wobei aber zum Einbau der Methylphosphonatbrücken Me die entsprechenden Methylphosphonat-Bausteine der Formel VIIIb im DNA-Reaktionszyklus eingesetzt werden.

Beispiel 21

5'-C_{s,s}A_{s,s}C GT_{s,s}T GAG (but)Ggg cat-hex (c-myc antisense)
(Beispiel für den Strukturtyp XIIa in Schema 1; s,s bedeutet eine Phosphorodithioat-Brücke).

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben, jedoch wird zum Einbau der Dithioat-Brücken der Baustein VIIIId eingesetzt und an diesen Stellen die Oxidation (Schritt 20) mit TETD durchgeführt.

Beispiel 22

N-cga g(5'-NH-A)A CAT CA (Oeg(t))ggg cg-hex(c-fos antisense)
(5'-NH-A bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyadenylat; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, wobei nach Abschluß der DNA-Synthese analog zu Beispiel 13 ein 5'-Aminonucleotid ankondensiert wird, welches die Konjugation des zweiten PNA-Teils erlaubt. Es werden also zuerst sechs PNA-Synthesesyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sieben DNA-Synthesesyklen durchgeführt, wobei im letzten Zyklus der Baustein der Formel VIIIIf eingesetzt wird. Nachdem noch vier PNA-Synthesesyklen durchgeführt wurden, wird die Abspaltung vom Träger und weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 19 beschrieben vorgenommen.

Beispiel 23

F-cga g(5'-NH-A)A CAT CAT GGT _sC_sG-O-CH₂CH(OH)CH₂-O-C₁₅H₃₃
(5'-NH-A bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyadenylat; F einen Fluorescein-Rest am Aminoterminus des PNA und seine Phosphorothioat-Brücke)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 19 beschrieben, jedoch ausgehend von einem CPG-Träger, der den Glycerol-hexadecylether gebunden hält. Nach Ausführung von 12 DNA-Synthesesyklen wird der Linkerbaustein VIIIIf ankondensiert. Nachdem vier PNA-Synthesesyklen durchgeführt und die endständige Mmt-Gruppe abgespalten wurde, kann die freie Aminofunktion mit einem 30-fachen Überschuß an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) quantitativ umgesetzt werden.

Beispiel 24

3'-CCC TCT T-5'-(PEG)(PEG)-(Oeg(t))tg tgg g-hex
(PEG bedeutet einen Tetraethylenglycolphosphatrest)

Die Synthese erfolgt bezüglich des PNA-Teils analog wie in Beispiel 17 beschrieben. Nachdem sechs PNA-Einheiten ankondensiert wurden, wird das (Mmt-Oeg(t)-OH) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Als Linker

wird dann wie im DNA-Synthesesyklus beschrieben zunächst zweimal das Tetraethylenglycolderivat der Formel XV ankondensiert, bevor die Synthese des DNA-Teils mit umgekehrter Orientierung (von 5' nach 3') durchgeführt wird. Dazu verwendet man in den DNA-Synthesesyklen anstelle der Nucleosid-3'-phosphoramidite im Schritt 16 jeweils die entsprechenden Nucleosid-5'-phosphoramidite der Formel XIV, die kommerziell erhältlich sind. Die weitere Entschützung und Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 17 beschrieben.

Beispiel 25

N-ccc tct t-(C6-link)(PEG)-3'-AAG AGG G-5'

(PEG bedeutet einen Tetraethylenglycolphosphatrest; C6-link ist ein 6-Aminohexanolphosphatrest)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 (DNA-Synthesesyklus) beschrieben, jedoch ausgehend von einem CPG-Träger, der 3'-O-Dmt-Desoxyguanosin über eine 5'-O-Succinatgruppe gebunden hält. Nachdem sechs DNA-Einheiten mit Hilfe der Bausteine der Formel XIV ankondensiert wurden, wird als Linker zunächst einmal das Tetraethylenglycolderivat der Formel XV ankondensiert, bevor zur Einführung von C6-link das Phosphoramidit der Formel XVI gekuppelt wird. Danach wird der PNA-Teil wie in Beispiel 17 (PNA-Synthesesyklus) ansynthetisiert. Die weitere Entschützung und Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 19 beschrieben.

Beispiel 26

5'-TTT TTT TTT (but) ttt ttt-hex

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben. Bevor das Produkt vom Träger gespalten und entschützt wird, entnimmt man eine Hälfte des trägergebundenen DNA/PNA-Hybrids zur Fluoreszenzmarkierung (Beispiel 27).

Die andere Hälfte wird wie in Beispiel 17 beschrieben entschützt und aufgearbeitet.

Beispiel 27

(FAM ist Fluorescein-Rest)

5'-FAM-TTT TTT TTT (but) ttt ttt-hex

Das trägergebundene DNA/PNA-Hybrid aus Beispiel 26 wird fluoreszenzmarkiert, indem die Schritte 13 bis 20 wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt werden, wobei im Schritt 16 das Fluoresceinphosphoramidit der Fa. Applied Biosystems eingesetzt wird.

Beispiel 28

5'-GGG GGG GGG (but) ttt ttt-hex

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben. Bevor das Produkt vom Träger gespalten und entschützt wird, entnimmt man eine Hälfte des trägergebundenen DNA/PNA-Hybrids zur Fluoreszenzmarkierung (Beispiel 29).

Die andere Hälfte wird wie in Beispiel 17 beschrieben entschützt und aufgearbeitet. Die Titelverbindung bindet als Triplex-forming Oligonucleotid mit hoher Affinität an einen DNA-Doppelstrang, der das Homopurin-Motiv 5'-AAA AAA GGG GGG GGG-3' enthält.

Beispiel 29

(FAM ist Fluorescein-Rest)

5'-FAM-GGG GGG GGG (but) ttt ttt-hex

Das trägergebundene DNA/PNA-Hybrid aus Beispiel 28 wird fluoreszenzmarkiert, indem die Schritte 13 bis 20 wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt werden, wobei im Schritt 16 das Fluoresceinphosphoramidit der Fa. Applied Biosystems eingesetzt wird.

Beispiel 30

Biotin-C_{Phe}G_{Phe}A GAA cat ca t(5'NH-G)G(OMe)U(OMe) C(OMe)G(OMe)-VitE (c-fos antisense)
 (N(OMe) bedeutet eine Nucleotideinheit N mit einer 2'-O-Methoxygruppe; P_{he} bedeutet eine Phenylphosphonat-Brücke; 5'NH-G bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyguanylat).

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben ausgehend von CPG, welches mit Vitamin E beladen ist (MacKellar et al. (1992) Nucleic Acids Res, 20(13), 3411-17) und viermalige Kupplung des Bausteins der Formel VIIIe nach dem DNA-Syntheszyklus. Nach Aufkupplung des 5'-Aminonucleotid-Bausteins der Formel VIII f werden sechs PNA-Einheiten nach dem PNA-Syntheszyklus ankondensiert. Nach Neutralisation wird nach bekannter Methode das Phosphoramidit auf die Aminofunktion gekuppelt und der DNA-Syntheszyklus zum Aufbau des DNA-Teils entsprechend wiederholt, wobei im Falle der Phenylphosphonat-Brücken die Bausteine der Formel VIII c in Schritt 16 eingesetzt werden. Zuletzt erfolgt die Aufkopplung der Endgruppe mit dem Biotin-Phosphoramidit der Fa. Glen Research. Nach abgeschlossener Synthese wird das Oligomer wie in Beispiel 19 beschrieben entschützt, wobei die Dimethoxytritylgruppe am Ende durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22 ° C abgespalten wird.

Beispiel 31

A CAT CA (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisense)
 (Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben. Dabei werden zuerst fünf PNA-Synthesyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein Oeg(t) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sechs DNA-Synthesyklen durchgeführt. Anschließend wird die Abspaltung vom Träger und die weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 18 beschrieben vorgenommen.

Beispiel 32

A TAA TG (Oeg(t)) tct cg-hex (control oligomer for c-fos)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben. Dabei werden zuerst fünf PNA-Synthesyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein Oeg(t) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sechs DNA-Synthesyklen durchgeführt. Anschließend wird die Abspaltung vom Träger und die weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 18 beschrieben vorgenommen.

Beispiel 33

a cat cat ggt cg-hex (c-fos antisense)

Dieses reine PNA-Oligomer wurde als Referenzverbindung analog wie in Beispiel 18 hergestellt, jedoch mit der Ausnahme, daß zwölf PNA-Cyklen durchgeführt wurden. Die Entschützung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird in ammoniakalischer Lösung (5 Stunden bei 55 ° C) durchgeführt. Erst dann wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22 ° C abgespalten.

Beispiel 34

A (5-hexy-C)A(5-hexy-U) (5-hexy-C)A (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisense)
 (Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9; 5-hexy-C bedeutet 5-Hexinyl-cytidin, 5-Hexy-U bedeutet 5-Hexinyl-uridin)

Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 31 beschrieben, wobei jedoch anstelle der normalen Pyrimidin-Phosphoramidite die entsprechenden 5-Hexinylpyrimidin-nucleosid-phosphoramidite in die Kondensationsreaktion eingesetzt werden.

Beispiel 35

(FAM ist Fluorescein-Rest)
5'-FAM-TT (but) ttt ttt-hex

5

Die Synthese dieses PNA/DNA-Oligomers erfolgt analog wie in Beispiel 27 beschrieben, wobei allerdings nur zwei Thymidylat-Einheiten ankondensiert werden.

Beispiel 36

10

taa tac gac tca cta (5'HN-T)
(5'HN-T bedeutet 5'-Amino-5'-desoxythymidin)

Dieses PNA/DNA-Oligomer, das aus 15 PNA-Einheiten und einer Nucleosid-Einheit aufgebaut ist, wurde
15 als Primer für die DNA-Polymerase-Reaktion synthetisiert. Dabei geht man von einem Festphasen-Träger (Aminoalkyl-CPG) aus der das 5'-Monomethoxytritylamino-5'-deoxythymidin über dessen 3'-Hydroxygruppe als Succinat gebunden hält. Nach Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe mit 3 % TCA in Dichlormethan werden 15 PNA-Cyclen wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt. Die Entschützung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird in ammoniakalischer Lösung (5 Stunden bei 55 ° C) durchgeführt. Erst dann
20 wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22 ° C abgespalten. Man erhält ein PNA/DNA-Oligomer mit einer freien 3'-Hydroxygruppe, welche als Primer für eine DNA-Polymerase (Klenow) dient.

Beispiel 37

25

p_S-rA(2'5')rA(2'5')rA(2'5')rA-spacer-(Oeg(t))tc ctc ctg cgg-hex
(p_S bedeutet ein 5'Thiophosphat; spacer bedeutet ein Triethylenglycolphosphat; rA ist ein Riboadenylat; (2'5') bedeutet, daß die Internucleotidbindung von 2' nach 5' in der Ribose verläuft)

Die Synthese dieser Verbindung erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, indem zunächst 14 PNA-Einheiten ankondensiert werden. Nachdem der Linkerbaustein Mmt-Oeg(t)-OH aus Beispiel 9 unter den in Schritt 5 beschriebenen Bedingungen eingeführt wurde, spaltet man die Mmt Gruppe mit 3 % TCA ab und führt den Spacer mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Dmt-O-(CH₂CH₂O)₃-O-P(-OCH₂CH₂CN)N(i-C₃H₇)₃ Spacer-Phosphoramidits (Fa. Eurogentech; Brüssel) ein. Das (2'5')-verknüpfte Tetraadenylat wird
35 wie in Beispiel 17 beschrieben mit Hilfe des käuflichen N⁶-Benzoyl-5'-O-Dmt-3'-O-tert-butyldimethylsilyl-adenosin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidits (Fa. Milligen, Bedford, USA) ansynthetisiert, wobei die Kondensationszeit auf 2 x 5 Min. verlängert wird. Anstelle von Tetrazol wird in der Kupplungsreaktion der stärkere Aktivator 5-Ethylthiotetrazol eingesetzt. Nach Abspaltung der letzten Dmt-Gruppe wird das Oligomer mit Bis(β-cyanoethoxy)diisopropylaminophosphan an der 5'-OH-Gruppe phosphoryliert. Nach
40 Oxidation mit TETD und Entschützung mit Ammoniak und Desilylierung mit Fluorid erhält man die Titelverbindung, welche RNase L stimuliert.

Beispiel 38

45

p_S-Co(2'5')Co(2'5')Co(2'5')Co-spacer-(Oeg(t))tc ctc ctg cgg-hex
(p_S bedeutet ein 5'Thiophosphat; spacer bedeutet ein Triethylenglycolphosphat; Co ist Cordycepin (3'-Deoxyadenosin); (2'5') bedeutet, daß die Internucleotidbindung von 2' nach 5' in verläuft)

Die Synthese wird analog wie in Beispiel 37 durchgeführt, jedoch wird anstelle des N⁶-Benzoyl-5'-O-Dmt-3'-O-tert-butyldimethylsilyl-adenosin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidits das entsprechende N⁶-Benzoyl-5'-O-Dmt-cordycepin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidit (Fa. Chemo-
50 gen, Konstanz) eingesetzt und die Fluoridbehandlung entfällt.

55

Beispiel 39

5'-GG GGG GGG (Oeg(t)) ttt ttt ttt-hex

- 5 Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, wobei nach neun PNA-Kupplungen der Linkerbaustein Mmt-Oeg(t)-OH aus Beispiel 9 unter den in Schritt 5 beschriebenen Bedingungen ankondensiert wird, der die nachfolgende Kondensation von acht Guanylatresten erlaubt. Das resultierende PNA/DNA-Oligomer bindet mit hoher Affinität in antiparalleler Orientierung als Triplex-Forming-Oligonucleotid an doppelsträngige DNA, welche die Sequenz 5'...AAAAAAAAAAGGGGGGGG...3' aufweist.

10

Beispiel 40

Charakterisierung der PNA/DNA-Hybride

- 15 Die Charakterisierung erfolgt mit Hilfe der HPLC, Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Negationen Elektrospray Massenspektrometrie (ES-MS⁻). Die Produkte werden wie oben beschrieben gereinigt und zeigen danach bei der PAGE (20% Acrylamid, 2% Bisacrylamid und 7 M Harnstoff) eine einheitliche Bande. Die HPLC erfolgt auf Reversed Phase Säulen RP-18 der Fa. Merck (Eluent A:Wasser mit 0.1% TFA, B: Wasser/Acetonitril = 1:4; linearer Gradient) oder auf einer PA-100-Säule der Fa. Dionex (Eluent A: 20
20 mM NaOH and 20 mM NaCl; B:20 mM NaOH und 1.5 M NaCl; linearer Gradient). Für die ES-MS⁻ werden die PNA/DNA-Hybride durch Ammoniumacetat-Fällung oder andere Umsalzung in die Ammonium-Salze übergeführt. Die Probenaufgabe erfolgt aus einer Lösung in Acetonitril/Wasser (1:1) mit 5 OD₂₆₀/ml Oligomer. Die Genauigkeit der Methode liegt bei ca. ± 1.5 Dalton.

25 Beispiel 41

Bestimmung der Zellaufnahme und Stabilität nach radioaktiver Markierung

Radioaktive Markierung:

- 30 Eine allgemein anwendbare Markierung mit ³⁵S besteht darin, daß man bei der Synthese des DNA-Teils mindestens eine Oxidation im DNA-Syntheszyklus (Schritt 20 in Beispiel 17) mit elementarem ³⁵S durchführt. PNA/DNA-Hybride, die eine freie 5'-Hydroxygruppe haben, können mit Hilfe der Polynucleotid-Kinase nach an sich bekannten Methoden mit ³²P oder ³⁵S markiert werden. PNA/DNA-Hybride, die eine freie 3'-Hydroxygruppe tragen, können nach bekannter Art mit 3'-terminaler
35 Transferase markiert werden. Als Beispiel ist hier die 5'-Markierung des DNA-Teils wiedergegeben: Das PNA/DNA-Hybrid mit einer freien 5'-Hydroxygruppe (500 pmol) aus Beispiel 17, 18 oder 26 wird in 425 µl Wasser gelöst, diese Lösung auf 90 °C erhitzt und abgeschreckt. Dann gibt man 50 µl 10 x Kinase-Puffer und 50 µl ³²P Gamma-ATP (6000 Ci/ mmol) bzw. ³⁵S-Gamma-ATP zu und inkubiert 1 Stunde bei 37 °C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.5 M EDTA-Lösung gestoppt. Die Entsalzung erfolgt mit Hilfe einer
40 NAP^R-Säule der Firma Pharmacia.

Bestimmung der Zellaufnahme:

- Man inkubiert Vero-Zellen in 96-Napf Mikrotiterplatten in DMEM, 5 % FCS für 24 Stunden bei 37 °C. Nachdem das Medium entfernt wurde, wäscht man die Zellen noch zweimal mit serumfreien DMEM. Das radioaktiv markierte Oligomer (10⁶cpm) wird mit nichtmarkiertem Oligomer auf eine Konzentration von 10
45 µM in Serum verdünnt und die Zellen bei 37 °C damit inkubiert. Nach 1, 7 und 24 Stunden werden jeweils 150 µl entnommen (Bezeichnung: "Überstand 1"). Die Zellen in den Näpfen der Mikrotiterplatten werden 7-mal mit 300 µl frischem Medium gewaschen und die vereinigten Waschmedien (Bezeichnung: "Überstand 2") im Szintillationszähler gemessen. Danach gibt man 100 µl Trypsinlösung zu, wartet 30 Sekunden und zieht den Überstand ab. Zur Ablösung der Zellen von der Platte inkubiert man 3 Min. bei 37 °C. Die
50 abgelösten Zellen werden in 1.5 ml Eppendorf-gefäße übergeführt und bei 2000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert ("Überstand 3"). Die Überstände 1 (5µl), 2 und 3 (0.5 ml) werden jeweils separat am Szintillationszähler gemessen. Daraus errechnet sich die Aufnahme des Oligomers in pmol per 100 000 Zellen, wobei Überstand 3 die zellgebundene Oligomerfraktion und die Summe der Überstände 1 und 2 die nicht zellgebundene Oligomerfraktion darstellen.

55

Ergebnis:

5

Inkubationszeit in Stunden	Zellaufnahme in pmol Oligomer / 10 ⁵ Zellen	
	PNA/DNA-Hybrid	DNA
1	0.25	0.36
7	0.54	0.57
24	0.75	0.78

10

Untersuchung der Stabilität des Oligomers im Medium mit Zellen:

Der Überstand 1 (10 µl) wird mit 5 µl 80 % Formamid (mit Xylencyanol und Bromphenolblau) gemischt, auf 95 °C erhitzt (5 Minuten) und auf ein Polyacrylamidgel (20 % Acrylamid, 7 M Harnstoff) geladen. Nach der Entwicklung des Gels im elektrischen Feld ordnet man die Banden auf dem Gel mittels Autoradiographie dem "Stabilen Oligomer" bzw. die Fehlbanden dem "abgebauten Oligomer" zu.

Das PNA/DNA-Oligomer aus Beispiel 26 ist nach 24 Stunden Inkubationszeit zu 69 % stabil; DNA-Oligomer zu 3 % stabil.

Das PNA/DNA-Oligomer aus Beispiel 31 besitzt unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von 32 h, während das entsprechende DNA-Oligonucleotid eine Halbwertszeit von ca. 2 h aufweist.

Beispiel 42

Bestimmung der Zellaufnahme nach Fluoreszenz-Markierung:

25

Man läßt die COS-Zellen bis zur Konfluenz in Dulbecco's MEM, das mit 10 % FCS supplementiert wurde, in 5 cm Petrischalen heranwachsen. Die Zellen werden zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Mit Hilfe einer sterilen Nadel wird eine Fläche von ca. 1 cm² in der Mitte der Petrischale eingekratzt. In diese Fläche wird die zu untersuchende PNA/DNA-Oligomerlösung (0.1 mM) aufgebracht. Es wird bei 37 °C unter CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach 2, 4 und 16 Stunden werden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu werden die Zellen viermal mit serumfreien DMEM gewaschen, mit einem Glasträger abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Phasenkontrast bewertet. Als Vergleich zu den PNA/DNA-Hybridmolekülen wurde ein fluoreszenzmarkiertes PNA (ohne DNA-Teil) F-(but)-ttt ttt-hex untersucht. Nach zwei Stunden Inkubation der Zellen mit diesem PNA zeigen > 90 % der Zellen Anzeichen starker morphologischer Veränderungen und Zelltod.

35

Die meisten Zellen weisen starke Vakuolisierung auf. Die Plasmamembran, das Cytosol und der Nucleus zeigen keine Aufnahme an PNA. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation mit dem reinen PNA sind alle Zellen abgestorben. Anders verhält es sich mit den erfindungsgemäßen DNA/PNA-Oligomeren. Bereits nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit den DNA/PNA-Oligomeren weisen die Zellen eine punktförmige intrazelluläre Verteilung der DNA/PNA-Oligomeren auf. Die Zellen erleiden auch nach längerer Inkubation keinen Zelltod.

40

Beispiel 43

Bestimmung der Schmelztemperaturen:

45

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgen mit Hilfe eines HP 8452A Diodenarray-Spektrophotometers, eines HP 89090A Peltier-Elements und der HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). Es wird in 0.5 °C/min. Schritten in 10mM HEPES und 140 mM NaCl (pH 7.5) als Puffer gemessen. Die Oligomerkonzentration beträgt 0.5 bis 1 OD₂₆₀ pro ml.

50

Ergebnis für das Produkt aus Beispiel 17 bzw. 18:

55

T_M gegen DNA

5	5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a gtc-hex 3'-TAG CAG CAT A A T CAG-5'	$T_M = 51.5 \text{ }^\circ\text{C}$ antiparallel
10	5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a gtc-hex 5'-TAG CAG CAT A A T CAG-3'	$T_M < 20^\circ\text{C}$ parallel
15	5'-ATC GTC GTA TT(but)a gtc-hex 3'-TAG CAG CAT AA T CAG-5'	$T_M = 51.0 \text{ }^\circ\text{C}$ antiparallel
20	5'-ATC GTC GTA TTA GTC-3' 3'-TAG CAG CAT AAT CAG-5'	$T_M = 50.5 \text{ }^\circ\text{C}$ DNA-DNA antiparallel
25	5'-ATC GTC GTA TT(but) a gtc-hex 5'-TAG CAG CAT AA T CAG-3'	$T_M < 20^\circ\text{C}$ parallel
30		
35		
40		
45		
50		
55		

Sequenz			T_M gegen DNA	T_M gegen RNA (T = U)
5				
10	5'- ACA TCA TGG TCG -3' 3'- TGT AGT ACC AGC -5'	DNA ap	50.7 °C	48.6 °C
15	5'- ACA TCA tgg tcg -3' 3'- TGT AGT ACC AGC -5'	(PNA-DNA) ap	54.5 °C	54.7 °C
20	5'- ACA TCA tgg tcg -3' 5'- TGT AGT ACC AGC -3'	(PNA-DNA) p	20 °C	< 20 °C
25				
30	5'- aca tca tgg tcg -3' 3'- TGT AGT ACC AGC -5'	PNA ap	58.8 °C	66.6 °C
35	5'- aca tca tgg tcg -3' 5'- TGT AGT ACC AGC -3'	PNA p	46.3 °C	44.8 °C
40	5'- ACA TCA <u>TGG TCG</u> -3' 3'- TGT AGT ACC AGC -5'	S-DNA ap	46.7 °C	43.8 °C

45 TGG TCG bedeutet ein DNA-Teil, bei dem alle Internucleotid-Bindungen als Phosphorothioat vorliegen.
Definition für p und ap s. Seite 5.

Beispiel 44

Testung auf antivirale Aktivität:

50 Die antivirale Aktivität der Prüfsubstanzen gegen verschiedene humanpathogene Herpesviren wird im Zellkulturtestsystem untersucht. Für den Versuch werden Affennierenzellen (Vero, 2×10^5 /ml) in serumhaltigem Dulbecco's MEM (5 % Fötales Kälberserum FCS) in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das serumhaltige Medium wird dann abgesaugt und die Zellen werden
55 zweimal mit serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) überspült. Die Testsubstanzen werden in H₂O auf eine Konzentration von 600 µM vorverdünnt und bei -18 °C aufbewahrt. Für den Test erfolgen weitere Verdünnungsschritte in Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Je 100 µl der einzelnen Prüfsubstanzverdünnungen werden zusammen mit 100 µl serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) zu den gespülten Zellen

gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ werden die Zellen mit Herpes simplex Virus Typ 1 (ATCC VR733, HSV-1 F-strain) oder mit Herpes simplex Virus Typ 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-Strain) infiziert in Konzentrationen, bei denen der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen vollkommen zerstört wird. Bei HSV-1 beträgt die Infektionsstärke 500 Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro Napf, bei HSV-2 350 PFU/Napf. Die Versuchsansätze enthalten dann Prüfsubstanz in Konzentrationen von 80 µM bis 0,04 µM in MEM, ergänzt durch 100 U/ml Penicillin G und 100 mg/l Streptomycin. Alle Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt mit Ausnahme der Kontrollen, die achtfach je Platte durchgeführt werden. Die Versuchsansätze werden 17 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Cytotoxizität der Prüfsubstanzen wird nach 20 h Gesamtinkubationszeit durch mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen bestimmt. Als Dosis tolerata maxima (DTM) wird die höchste Präparatkonzentration bezeichnet, die unter den genannten Versuchsbedingungen noch keine mikroskopisch erkennbaren Zellschädigungen hervorruft. Es erfolgt daraufhin die Zugabe von FCS auf eine Endkonzentration von 4 % mit weiterer Inkubation für 55 h bei 37 °C und 5% CO₂. Die unbehandelten Infektionskontrollen zeigen dann einen kompletten cytopathischen Effekt (CPE). Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellkulturen werden diese dann mit Neutralrot entsprechend dem Vitalfärbungsverfahren nach Finter (1966) angefärbt. Die antivirale Aktivität einer Testsubstanz wird definiert als minimale Hemmkonzentration (MHK), die benötigt wird, um 30-60 % der Zellen vor dem virusbedingten cytopathogenen Effekt zu schützen. Die Aktivität der PNA/DNA-Chimären ist jeweils besser als die der entsprechenden DNA-Oligomeren oder PNA-Oligomeren.

20 Beispiel 45

Bestimmung der in vivo Aktivität: Inhibition der c-Fos Protein-Expression in der Ratte:

Die Bestimmung erfolgt wie beschrieben (Sandkühler et al. (1991) in :

Proceedings of the VIth World Congress on Pain, Charlton and Woolf, Editors; Elsevier, Amsterdam; Seite 313-318) durch Superfusion des Rückenmarks.

Nach Laminektomy einer Barbiturat-anästhesierten Sprague-Dawley Ratte wird ein Zweikammer-Behälter aus Silikon zur Aufnahme des Antisense Oligomers gebildet. Eine Kammer wird mit dem Antisense PNA/DNA-Derivat gefüllt, während die andere Kammer mit dem Kontroll Oligomer gefüllt wird (Konzentration je 75 µM). Jeweils nach einer Stunde wird das Superfusat ausgetauscht. Nach 6 Stunden Superfusion wird die c-fos Expression durch Hitzebehandlung (52 °C) der Hinterläufe stimuliert. Die Inhibition der c-fos Expression kann immunohistochemisch an entsprechenden Gewebeschnittproben nachgewiesen werden. Das c-fos Antisense-Oligonucleotid aus Beispiel 31 bewirkt eine stärkere Inhibition der c-fos Expression als das entsprechende DNA-Oligonucleotid und das entsprechende PNA-Oligomer aus Beispiel 33.

35 Beispiel 46

RNase-H-Assay

Zur Bestimmung der RNase-H-Aktivität werden 1.3 OD des zu untersuchenden PNA/DNA-Oligomers mit 0.5 OD der komplementären RNA-Sequenz (Target-Sequenz) in 50 µl autoklaviertem, mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser, gelöst; 5 Minuten auf 80 °C erwärmt und anschließend binnen 15 Minuten auf 37 °C abgekühlt. Hierdurch werden zunächst beide Oligomere denaturiert, die nach Abkühlen in sequenzspezifischer Weise einen Nucleinsäure-Doppelstrang ausbilden.

Für den Test inkubiert man diesen RNA•PNA/DNA-Duplex mit 10 µl RNase H 10x Puffer, 1 µl Dithiothreitol (DTT) und 2 µl (entsprechend 10 u) RNase H der Firma USB. Der Inkubationsansatz wird mit autoklaviertem, DEPC behandeltem Wasser, auf das gewünschte Gesamtvolumen von 100 µl vervollständigt. Die Proben werden bei 37 °C inkubiert. Für die kinetische Untersuchung wurden nach 0, 2 min, 10 min, und 1 h jeweils 20 µl der Lösung abgenommen, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und bei -70 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Untersuchung der RNase H-Spaltung der RNA erfolgt durch Gelelektrophorese.

Es zeigte sich, daß PNA/DNA-Hybride, die Desoxyribonucleotid-Bausteine enthalten, die RNase H aktivieren, wobei der komplementäre RNA-Strang gespalten wird, während das PNA/DNA-Oligomer unversehrt aus der Reaktion hervorgeht. Die Spaltungsreaktion mit dem PNA/DNA-Oligomer verläuft etwas langsamer als mit einem entsprechenden Oligodeoxyribonucleotid gleicher Länge und Sequenz.

55

Beispiel 47

Herstellung eines HeLa-Zellextraktes mit RNase L-Aktivität

- 5 Um die Aktivität der zellulären Endoribonuklease L durch die 2'5'-Tetraadenylat-PNA/DNA-Konjugate zu stimulieren, wurde ein HeLa-Zellextrakt hergestellt. Dazu versetzt man 35 Flaschen mit je 20 ml Medium mit Dulbeccos MEM (minimal essential medium) und 10 % FCS (fötales Kälberserum). Die Ernte der Zellen kann nach Trypsinbehandlung vorgenommen werden. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm werden 4 ml Zellernte erhalten. Diese füllt man zunächst mit 4 ml Wasser auf und gibt nach 3 Minuten 4 ml Puffer A
- 10 (5,48 g HEPES; 15,5 g KCl; 2,488 g Mg-Acetat; 1232 µl 2-Mercapto-ethanol ad 1 l Wasser) zu, um die Zellen zu lysieren. Anschließend zentrifugiert man die Lösung für 30 Minuten bei 0 °C in einer Ultrazentrifuge bei 30.000 rpm (ca. 100.000 g). Der Überstand von 8 ml Zellextrakt wird abgenommen und für die folgenden Untersuchungen bei -20 °C eingelagert.

15 Beispiel 48

Untersuchung auf Aktivierung der RNase L

- Für die Untersuchung dieses Extraktes auf die Endonuklease L werden zunächst 0,3 OD der RNA-Targetsequenz mit den jeweiligen PNA/DNA-Oligomeren 5 Minuten auf 80 °C erwärmt und anschließend zur Hybridisierung auf 37 °C abgekühlt. Der Duplex wird mit 20 µl des Extraktes, 1,2 µl Glycerin und RNase L-Puffer versetzt und bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen beträgt anschließend 70 µl. Für die kinetischen Untersuchungen werden Proben zu den Zeiten 0, 20 und 60 Minuten abpipettiert und zur Denaturierung der Enzyme 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Proben werden in einem Speedvac lyophilisiert
- 20 und durch Gelelektrophorese analysiert. Die PNA-2'5'-Tetraadenylat-Konjugate bzw. Tetracordycepin-Analoga aktivieren die zelluläre RNase L, während entsprechende Verbindungen ohne den Tetraadenylat-Teil die RNase L nicht stimulieren.

Beispiel 49

30

DNA-Polymerase-Reaktion

- Als Templat für die DNA-Polymerase Reaktion dient folgendes 81-mer Oligodeoxynucleotid:
 5'-GCC CCA GGG AGA AGG CAA CTG GAG CGA AGG CGC TTG TGG AGA AGG AGT TCA TAG CTG
 35 GGC TCC CTA TAG TGA GTG GTA TTA-3'
- Die Sequenz des PNA/DNA-Primers ist:
 H-taa tac gac tca cta (5NH-T)-OH 3'.

Als Kontroll-Primer wird ein entsprechendes Oligodeoxynucleotid der Sequenz 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3' eingesetzt.

- 40 Der Primer (0,15 nmol) und das Templat (0,15 nmol) in 5 µl 10x PCR Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH9, 1 % Triton X-100, 15 mM MgCl₂) werden mit 35 µl Wasser verdünnt und durch Erhitzen auf 95 °C und Abkühlen hybridisiert. Dann gibt man 10 µl 2mM dNTP-Mischung (Nucleosid-5'-triphosphate) und 3 µl DNA-Polymerase (Klenow Fragment) zu und inkubiert je 0,5 Stunden bei 22 °C und 37 °C. Die Reaktionslösung wird danach auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel (mit 1 % Bis) analysiert. Als Marker trägt man pBR322/HaeIII-Verdau auf. Die Reaktion mit dem Kontroll-Primer zeigt ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit der erwarteten Größe relativ zum Marker, während das Produkt aus dem PNA/DNA-Primer
- 45 etwas schneller wandert. In beiden Fällen wandert in der Gelelektrophorese der Doppelstrang wesentlich schneller als der Templat-Einzelstrang.

50 Patentansprüche

1. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel I,

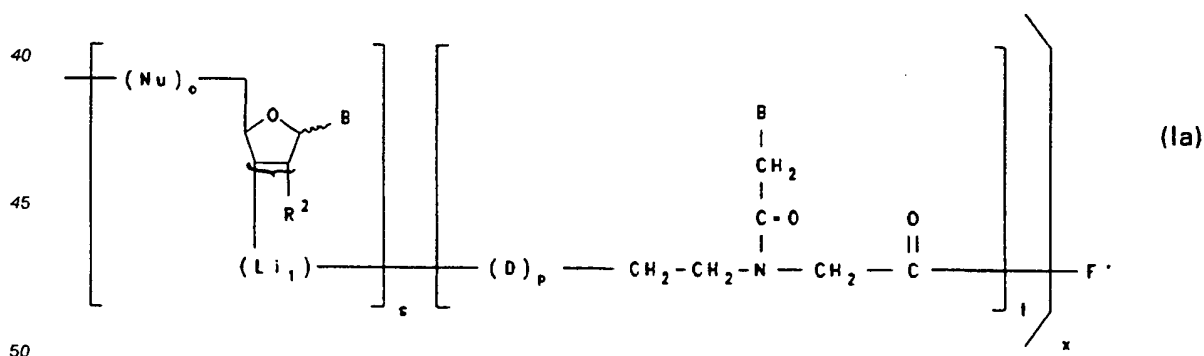
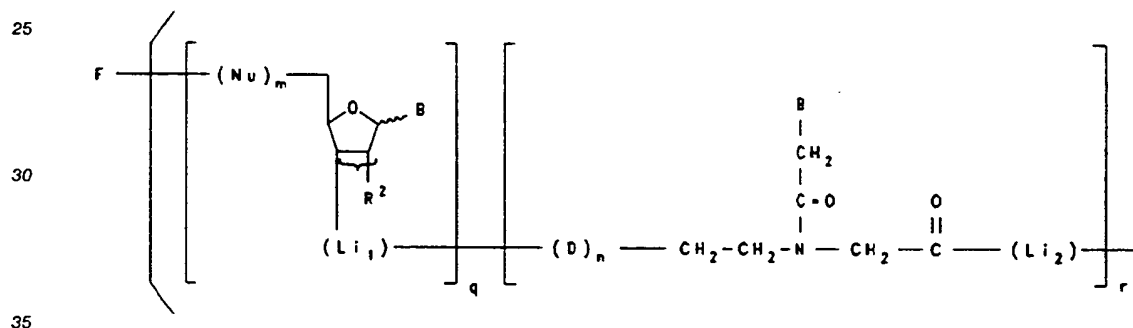


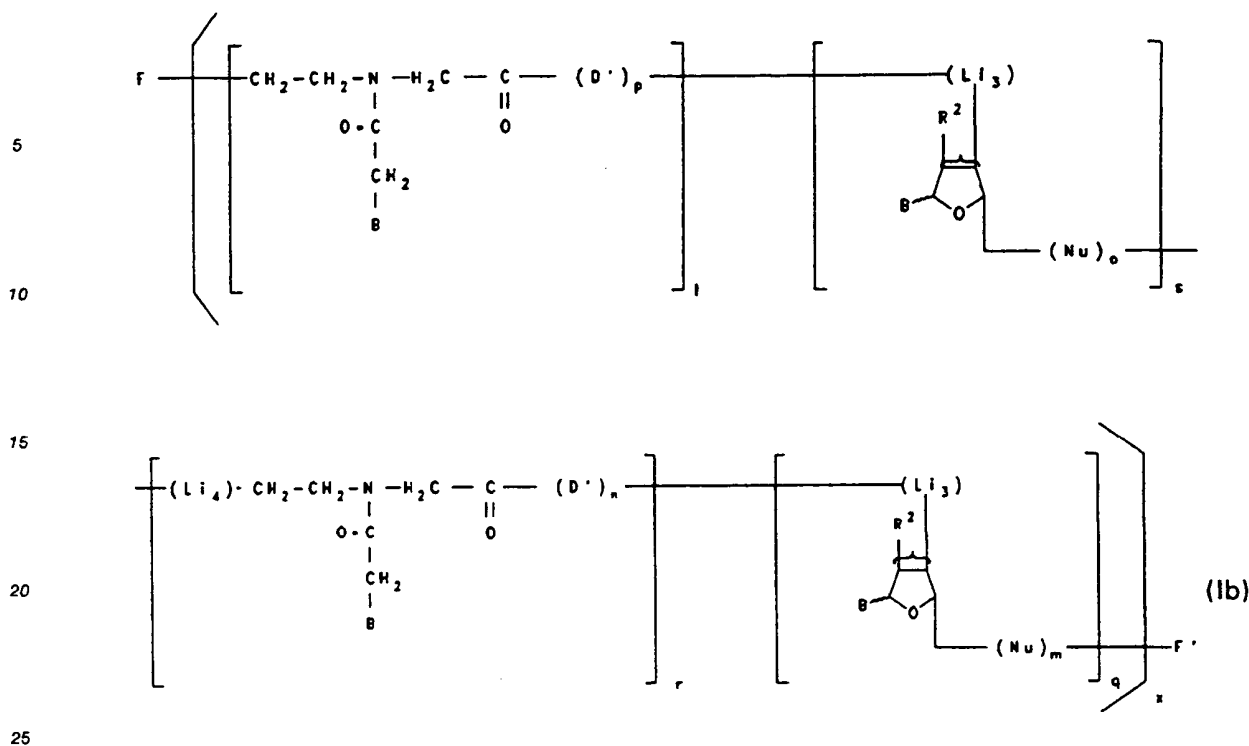
55

dadurch gekennzeichnet, daß

- q, r, s, t unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder mehrerer benachbarter q, r, s und t ≥ 2 sind;

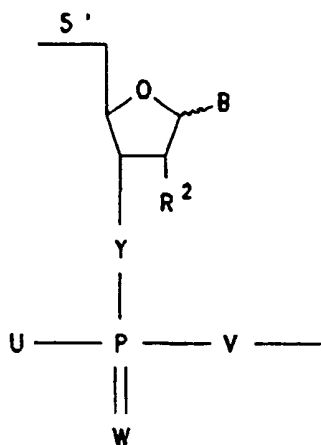
- x 1 bis 20 ist;
 DNA für eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA oder ein bekanntes Derivat derselben steht;
 Li eine kovalente Verknüpfung zwischen DNA und PNA ist, wobei die kovalente Verknüpfung eine Bindung oder einen organischen Rest mit mindestens einem Atom aus der Reihe C, N, O oder S beinhaltet;
 PNA eine Polyamidstruktur bedeutet, welche mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist; und
 F und F' Endgruppen sind und/oder über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.
2. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß x für 1 bis 5 steht.
 3. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß x für 1 steht.
 4. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß x 1 ist und
 q = r = 1 und s = t = Null oder
 r = s = 1 und q = t = Null oder
 q = r = s = 1 und t = Null oder
 r = s = t = 1 und q = Null sind.
 5. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formeln Ia und Ib gemäß den Ansprüchen 1 bis 4,



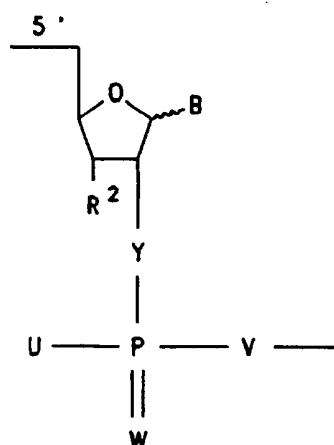


dadurch gekennzeichnet, daß

- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- x 1 bis 20 bedeutet, wobei für $x > 1$ $r = s = 1$ und gleichzeitig $q = t = \text{Null}$ und $o = n = \text{Null}$ bis 5 sind;
 - q, r, s, t unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder mehrerer benachbarter q, r, s und t ≥ 2 ist;
 - R^2 Wasserstoff, Hydroxy, C_1 - C_{18} -Alkoxy, Halogen, Azido oder Amino bedeutet;
 - B unabhängig voneinander für eine in der Nucleotidchemie übliche Base, beispielsweise für natürliche Basen wie Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin, Uracil, Inosin oder unnatürliche Basen wie beispielsweise Purin, 2.6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, $N^6 N^4$ -Ethanocytosin, $N^6 N^6$ -Ethano-2.6-diaminopurin, Pseudoisocytosin, 5-Methylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-(C_3 - C_6)-Alkynyluracil, 5-(C_3 - C_6)-Alkynylcytosin oder deren Prodrugformen steht, und die "geschweifte Klammer" andeutet, daß sich R^2 und der benachbarte Substituent in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können;
 - Nu für einen Rest der Formeln Ia oder Ib steht

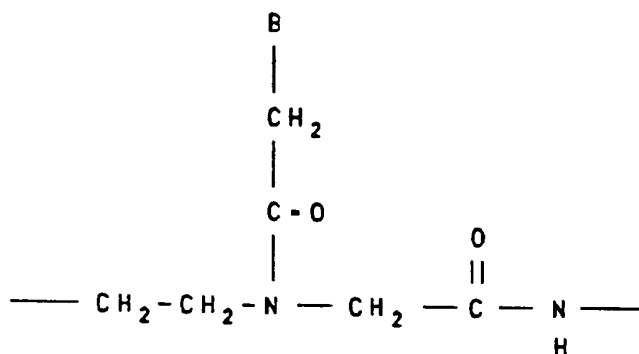


(I I a)



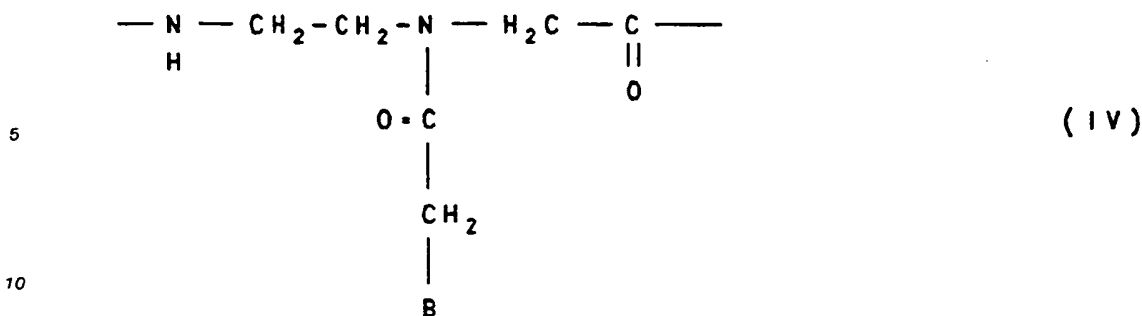
(I I b)

- R² und B
 U
 R³
 R⁴
 R³ und R⁴
 V
 W
 Y
 m
 o
 D
- worin
 wie oben definiert sind;
 Hydroxy, Mercapto, C₁-C₁₈-Alkyl, C₁-C₁₈-Alkoxy, C₆-C₂₀-Aryl, C₆-C₁₄-Aryl-
 C₁-C₈-alkyl, NHR³ oder NR³R⁴ bedeutet und
 C₁-C₁₈-Alkyl oder C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkyl ist, und
 C₁-C₁₈-Alkyl ist oder
 zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen hetero-
 zyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der
 Reihe O, S, N enthalten kann;
 Oxy, Sulfanidyl oder Imino bedeutet;
 Oxo oder Thioxo bedeutet;
 Oxy, Sulfanidyl, Methylen oder Imino bedeutet;
 = Null bis 20;
 = Null bis 20;
 einen Rest der Formel III bedeutet,



(I I I)

- D'
- worin B wie oben definiert ist;
 einen Rest der Formel IV bedeutet



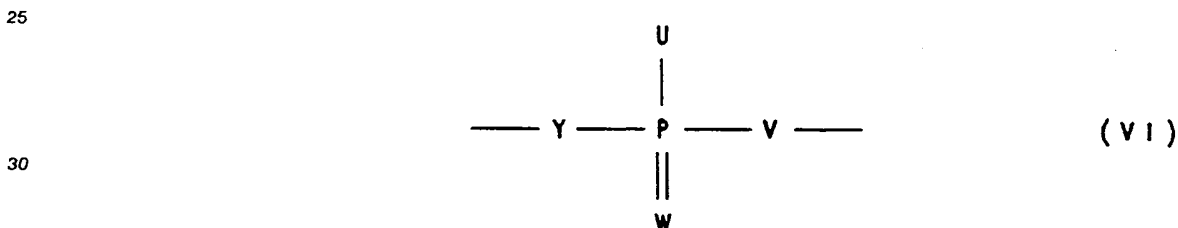
15

n = Null bis 20;
 p = Null bis 20;
 Li₁, Li₂, Li₃ und Li₄ unabhängig voneinander jeweils eine Struktur der Formel V

20

[(V')-(G)-(G')]_n (V)

ist, wobei unabhängig voneinander
 = 1 bis 5 ist,
 V' Sauerstoff, NH, eine Bindung oder einen Rest der Formel VI



35

bedeuten,
 worin U, V, W und Y wie oben definiert sind;

G C₁-C₁₂-Alkandiyl, wobei Alkandiyl gegebenenfalls durch Halogen, Amino, Hydroxy, C₁-C₁₈-Alkyl, C₁-C₁₈-Alkoxy, C₆-C₁₄-Aryl oder C₆-C₁₄-Aryl-C₁-C₁₈-Alkyl substituiert sein kann; C₆-C₁₄-Aryl-di-C₁-C₁₂-Alkandiyl oder einer Gruppe der Formel (CH₂CH₂O)_δCH₂CH₂, worin δ gleich 1 bis 11 sein kann; oder für eine Bindung stehen kann; und

40

G' Oxy, Sulfanidyl, Imino, -C(O)-, -C(O)NH-, eine Bindung oder einen Rest der Formel VI bedeuten, worin U, V, W und Y wie oben definiert sind; und

F und F' über eine Bindung verknüpft sind und/oder

45

F für R⁰ - (A)_k - V - und

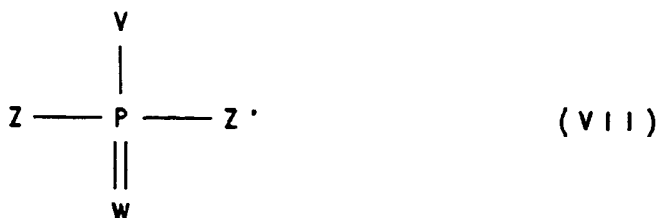
F' in Formel Ia für - (Q)₁ - R¹ und in Formel Ib für V¹ - (A)₁ - R¹ stehen, wobei R⁰ Wasserstoff, C₁-C₁₈-Alkanoyl, C₁-C₁₈-Alkoxy-carbonyl, C₃-C₈-Cycloalkanoyl, C₇-C₁₅-Aroyl, C₃-C₁₃-Heteroaroyl oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer

50

DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift; oder,

falls k = Null ist, R⁰ Wasserstoff ist oder zusammen mit V für einen Rest der Formel VII

55



steht, worin

Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, C₁-C₂₂-Alkoxy, C₁-C₁₈-Alkyl, C₆-C₂₀-Aryl, C₆-C₁₄-Aryl-C₁-C₁₈-Alkyl, C₁-C₂₂-Alkylthio, NHR³, NR³R⁴, oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und worin

R³, R⁴, V und W
R¹

wie oben definiert sind;
Wasserstoff oder Q^o

wobei R¹ immer nur dann Wasserstoff ist,
wenn gleichzeitig l = Null und

in Formel Ia t = Null und s = 1 und Li₁ eine Struktur der Formel V mit V' = Bindung, G = Bindung, ε = 1 und G' = Oxy, Sulfanidyl, Imino oder einen Rest der Formel VI mit U = Z

oder

in Formel Ib q = 1 oder q = r = Null und in F' = V¹ - (A)_i - R¹ mit V¹ = V bedeuten,

A und Q unabhängig voneinander den Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure, bevorzugt aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure, N-(2-Aminoethyl)glycin bedeuten;

Q^o

Hydroxy, OR¹, NH₂, NHR¹ bedeutet mit

R¹

= C₁-C₁₈-Alkyl und

R¹¹

= C₁-C₁₈-Alkyl, C₁-C₁₈-Aminoalkyl, C₁-C₁₈-Hydroxyalkyl;

V

wie oben definiert ist;

V¹

eine Bindung oder V ist, wobei in F' nur in Formel Ib mit q = Null und r = 1 V¹ immer für eine Bindung steht;

k

Null bis 10 ist;

l

Null bis 10 ist;

mit der Maßgabe, daß

a) falls in der Verbindung der Formel Ia t = Null und s = 1 sind, und Li₁ = (V') - (G) - (G') mit V' = Verbindung der Formel VI, G = C₂-C₁₂-Alkyl und G' = CO stehen, bedeutet in F' = - (Q)_i - R¹ l = Null bis 10 und R¹ = Q^o;

b) falls in der Verbindung der Formel Ia s = t = Null ist, steht Li₂ für eine Bindung;

c) falls in der Verbindung der Formel Ib t = Null und s = 1 sind, steht Li₃ für eine Bindung;

d) falls in der Verbindung der Formel Ib s = t = Null ist, steht Li₄ für eine Bindung;

wobei jedes Nucleotid in seiner D- bzw. L-Konfiguration vorliegen kann und sich die Base in α- oder β-Stellung befinden kann.

6. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formeln Ia und Ib gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Base in β-Stellung befindet.

7. Verfahren zur Herstellung von Polyamid-Oligonucleotid-Derivaten gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man sukzessive eine PNA-Einheit bzw. DNA-Einheit mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert.

8. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 zur Anwendung als Heilmittel.
9. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 zur Anwendung als Heilmittel bei der
Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden oder von Erkrankungen, die
durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflußt werden, bei der Behandlung von Krebs
oder bei der Verhinderung der Restenose.
10. Arzneimittel enthaltend ein Polyamid-Oligonucleotid-Derivat gemäß den Ansprüchen 1 bis 6.
11. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß den Anprüchen 1 bis 6 zur Anwendung als Gensonde.
12. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sich
an mindestens einem Ende eine Nucleosid-Einheit mit einer 3'-Hydroxygruppe befindet, zur Anwen-
dung als Primer.
13. Gensonden-Assay zur Bestimmung eines Oligo- bzw. eines Polynucleotid-Targets (RNA bzw. DNA),
dadurch gekennzeichnet, daß man eine Gensonde nach Anspruch 11 in einem homogenen oder
heterogenen Assay einsetzt.
14. Gensonden-Assay zur Bestimmung eines Oligo- bzw. eines Polynucleotid-Targets (RNA bzw. DNA),
dadurch gekennzeichnet, daß man einen Primer nach Anspruch 12 einsetzt.
15. Gensonden-Assay nach den Ansprüchen 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Target durch
Hybridisierung nach einer Targetamplifikation bestimmt wird.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 672 677 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
17.01.1996 Patentblatt 1996/03

(51) Int. Cl.⁶: **C07H 21/00**, **C08L 77/00**,
C12Q 1/68, **A61K 31/70**

(43) Veröffentlichungstag A2:
20.09.1995 Patentblatt 1995/38

(21) Anmeldenummer: **95103332.3**

(22) Anmeldetag: **08.03.1995**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

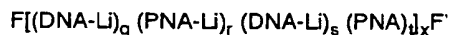
(30) Priorität: **14.03.1994 DE 4408528**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
D-65929 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• **Uhlmann, Eugen, Dr.**
D-61479 Glashütten (DE)
• **Breipohl, Gerhard, Dr.**
D-60529 Frankfurt (DE)

(54) **Polyamid-Oligonucleotid-Derivate, deren Herstellung und Verwendung**

(57) Es werden Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel



beschrieben, worin q, r, s, t unabhängig voneinander Null oder 1 bedeuten, wobei die Summe zweier oder mehrerer benachbarter q, r, s und t ≥ 2 sind; x 1 bis 20 ist; DNA für eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA oder ein bekanntes Derivat derselben steht; Li eine kovalente Verknüpfung zwischen DNA und PNA ist, wobei die kovalente Verknüpfung eine Bindung oder einen organischen Rest mit mindestens einem Atom aus der Reihe C, N, O oder S beinhaltet; PNA eine Polyamidstruktur bedeutet, welche mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist; und F und F' Endgruppen sind und/oder über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind, sowie deren physiologisch verträgliche Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Anwendung als Arzneimittel, als Sonde und als Primer.

EP 0 672 677 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 10 3332

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X,D	WO-A-92 20702 (BUCHARDT OLE ;EGHOLM MICHAEL (DK); NIELSEN PETER EIGIL (DK); BERG) 26.November 1992 * Abbildung 25 *	1-15	C07H21/00 C08L77/00 C12Q1/68 A61K31/70
P,X	--- J. CELL BIOCHEM. SUPPL. - KEYSTONE SYMPOSIUM ON RIBOZYMES. (15-21 JAN 1995) MEETING ABSTRACT A6-017, Bd. 19a, 1995 BECKENRIDGE, CO, USA, Seite 205 FREIER S.M. ET AL. 'Modified oligonucleotides: Hybridisation properties, pharmacokinetic properties and pharmacological activity.' * Zusammenfassung *	1-15	
A	--- EP-A-0 552 766 (HOECHST AG) 28.Juli 1993 * das ganze Dokument *		
A	--- EP-A-0 552 767 (HOECHST AG) 28.Juli 1993 * das ganze Dokument *		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C07H C08L C12Q A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 20.Oktober 1995	Prüfer Chakravarty, A
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 (01.92) (P04C01)